UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA LUZ VISÍVEL ASSOCIADA À FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO NA INATIVAÇÃO DA *Leishmania infantum chagasi* EM SANGUE DE CÃO

CRISTIANE BECK

Botucatu-SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA LUZ VISÍVEL ASSOCIADA À FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO NA INATIVAÇÃO DA *Leishmania infantum chagasi* EM SANGUE CANINO

CRISTIANE BECK

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes
Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco

Nome do Autor: Cristiane Beck

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Beck, Cristiane.
Efeito da luz visível associada à ftalocianina de cloro-alumínio na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino / Cristiane Beck. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Raimundo Souza Lopes
Coorientador: Antônio Cláudio Tedesco
Capes: 50501062

1. Cão - Doenças. 2. Leishmaniose visceral. 3. Ftalocianinas. 4. Espectroscopia visível.

Palavras-chave: Canino; ftalocianina de cloro-alumínio; leishmaniose visceral; luz visível.

Título: **EFEITO DA LUZ VISÍVEL ASSOCIADA À FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO NA INATIVAÇÃO DA *Leishmania infantum chagasi* NO SANGUE DE CÃES**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr Raimundo Souza Lopes
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária

Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha
Membro
Departamento de Clínica Veterinária

Profa. Dra. Sônia Terezinha dos Anjos Lopes
Membro
Departamento de Clínica de Pequenos Animais- UFSM-Santa Maria - RS

Profa. Dra. Luciana Mori Viero
Membro
Departamento de Estudos Agrários- UNIJUÍ - Ijuí - RS

Data da Defesa: 03 de junho de 2016.

“Se eu vi mais longe**, **foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me fortalecer a cada dia, me proteger e por demonstrar inúmeras oportunidades na minha vida.

Aos meus pais, que me deram todas as oportunidades e incentivo para que eu chegasse nessa etapa e que compreenderam meus momentos de ausência. Exemplos de honestidade e caráter, sempre me apoiando nos meus sonhos.

Aos meus sobrinhos e afilhados, que me transmitem muitas alegrias, deixando meus dias mais leves.

A toda minha família que me apoiou em muitos momentos, me dando força para mais essa conquista.

Ao meu orientador Raimundo Souza Lopes, um agradecimento especial, pela confiança, sabedoria e tranquilidade, por ter me apoiado em todas as fases e ter compreendido minhas dificuldades.

Ao meu co-orientador Antônio Cláudio Tedesco pelos ensinamentos e disponibilidade das instalações, materiais e equipamentos. Aos alunos e funcionários, em especial a sua orientada Nayara Resende que não mediu esforços para auxiliar em todas as etapas do experimento em Ribeirão Preto.

Aos professores da UNESP/Botucatu, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, que foram imprescindíveis desde que ingressei neste programa.

As colegas Daniela e Leizinara pelo acolhimento e auxílio durante o período do doutorado.

Aos professores da UFSM pelos ensinamentos nas disciplinas que realizei em Santa Maria.

Aos meus bolsistas do “Clube do Hamster” Mateus, Felipe, Artur e Paulo, pelo auxílio de cada dia, pelas descobertas e dificuldades que tivemos juntos, além dos momentos de descontração. Obrigada! Aprendi muito com vocês.

Ao professor Hélio Langoni por permitir que realizasse parte do meu experimento em seu laboratório. As residentes Talita, Giulia e Sâmea que, mesmo em uma rotina de trabalho e estudo intensa, não mediram esforços para me auxiliarem nos exames e esclarecerem minhas dúvidas.

A profª Drª Mary Marcondes e seus orientados, em especial ao Acácio Duarte Teixeira, pela imensa colaboração no projeto, nos auxiliando na coleta de materiais em Araçatuba.

A profª Drª Sônia pelos ensinamentos e incentivo desde a época de graduação, momento em que iniciei como estagiária do laboratório de patologia clínica da UFSM. Desde então, esta área segue comigo, fazendo parte da minha carreira docente. Obrigada por estar neste momento importante fazendo parte da minha banca avaliadora.

A amiga Luciana pela amizade, transparência, sinceridade e ajuda que sempre me proporcionou. Obrigada por me incentivar a ser mais corajosa, encarar os inúmeros desafios e por estar presente nesta etapa única.

As amigas e colegas de viagem a Santa Maria, companheiras de estrada, juntas encaramos as madrugadas de serração, para que pudéssemos realizar as disciplinas na UFSM.

A Bruna, uma aluna que me incentivou na pesquisa, e hoje minha colega de projetos, artigos, me acalmando em momentos de angústia. Obrigada por atender meus pedidos de socorro.

A Luana, amiga e companheira de viagem, que me acompanhou até São Paulo para a realização do experimento, com uma disposição incrível para encarar essa etapa.

Ao Giovani, amigo que me apoiou muito nesta fase, e divide comigo diversos momentos da minha vida.

Ao amigo Rogerião, pelas inúmeras informações que chegavam até a mim, pela preocupação da realização da minha matrícula, de créditos concluídos, e da cobrança da definição da data de defesa da minha tese, que foram essenciais nesse período.

Aos colegas da Unijuí, pela colaboração e incentivo, em especial ao meu colega de chefia Roberto Carbonera, a Maria Andréia pelas análises histológicas e a Cleusa e José pela elaboração das análises estatísticas.

A amiga Cláudia, pelas correções realizadas e sugestões oportunas na minha tese.

Aos membros da minha banca examinadora, por aceitarem o convite para participarem da minha defesa contribuindo para meu aprendizado.

A FAPESP pelo apoio financeiro do projeto.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de tamanho, polidispersão e potencial eletrônico da nanoemulsão vazia..... 19

Tabela 2 - Valores de tamanho, polidispersão e potencial eletrônico da nanoemulsão com ftalocianina de cloro-alumínio..... 19

Tabela 3 - Medidas obtidas da luz visível de acordo com a área a ser incidida na placa contendo sangue parasitado..... 20

Tabela 4 - Grupos utilizados com o respectivo tratamento..... 20

Tabela 5 - Resultados dos exames microscópicos do baço e fígado nos diferentes grupos após 90 dias de inoculação..... 30

Tabela 6 - Resultados dos exames microscópicos do baço e fígado nos diferentes grupos após 180 dias de inoculação..... 31

Tabela 7 - Resultados da PCR convencional, aos 180 dias, dos hamsters do grupo inoculado com sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi*, das amostras de baço, fígado e medula óssea..... 35

Tabela 8 - Resultados da PCR convencional, aos 180 dias, dos hamsters do grupo inoculado com sangue tratado com luz visível associada à ftalocianina de cloro-alumínio, das amostras de baço, fígado e medula óssea..... 35

Tabela 9 - Resultados da carga parasitária/mL, avaliados pela técnica da qPCR, no baço, fígado e medula óssea, de um hamster de cada grupo após 90 dias de inoculação..... 37

Tabela 10 - Resultados estatísticos da carga parasitária (/mL) obtida pela qPCR do baço, nos grupos doença (G2) e tratado com AlClPc (G3), irradiada com luz visível por 11 minutos, num comprimento de onda de 630 nm, após 180 dias de inoculação..... 38

Tabela 11- Resultados estatísticos da carga parasitária (/mL) obtida pela qPCR do fígado, nos grupos doença (G2) e tratado com AlClPc (G3), irradiada com luz visível por 11 minutos, num comprimento de onda de 630 nm, após 180 dias de inoculação..... 39

Tabela 12- Resultados estatísticos da carga parasitária (/mL) obtida pela qPCR da medula óssea, nos grupos doença (G2) e tratado com AlClPc (G3), irradiada com luz visível por 11 minutos, num comprimento de onda de 630 nm, após 180 dias de inoculação. 39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas promastigotas (A), e amastigotas em macrófago de canino (B) de *Leishmania infantum chagasi*..... 03

Figura 2 - Ciclo evolutivo no hospedeiro invertebrado (A) e no hospedeiro vertebrado (B), demonstrando as formas amastigotas e promastigotas, no flebotomíneo e na corrente circulatória..... 04

Figura 3 - Espectro de absorção da nanoemulsão contendo ftalocianina de cloro-alumínio 45,89 µM. L^{-1}..... 19

Figura 4 - Aparelho Applied Biosystem® utilizado para a realização da qPCR..... 26

Figura 5 - Apresentação do percentual de órgãos com alterações macroscópicas dos grupos..... 29

Figura 6 - Médias da carga parasitária das amostras de órgãos analisadas, obtidas pela análise da qPCR, do grupo doença e tratado após 180 dias de inoculação..... 40

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AlClPc	Ftalocianina de cloro-alumínio
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
G	Grama
ºC	Graus celsius
IgG	Imunoglobulina G
IFN-δ	Interferon gama
IL	Interleucina
J/ cm^2	Joule por centímetro quadrado
<	Menor
µL	Microlitro
µM.L	Micromol por litro
Mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
$mg.kg^{-1}$	Miligrama por quilograma
mL	Mililitro
mV	Milivolt
mW	Miliwat
Min	Minuto
nm	Nanômetro
%	Percentagem
/mL	Por mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
Rpm	Rotações por minuto
TNF	Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Atestado - Protocolo n° 40/2014..... 70

Anexo B - Atestado - Protocolo n° 42/2014..... 71

Anexo C - Laudo citopatológico do canino doador do sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi*..... 72

SUMÁRIO

Página
RESUMO.....xv
ABSTRACT.....xvi
1. INTRODUÇÃO.....1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....3
2.1 Leishmaniose Visceral Canina.....3
2.1.1 Etiologia e Patogenia.....3
2.1.2 Diagnóstico.....6
2.2 Transfusão sanguínea.....11
2.3 Terapia fotodinâmica.....12
2.3.1 Inativação com ftalocianina associada à luz visível.....13
3. OBJETIVOS.....15
3.1 Geral.....15
3.2 Específico.....15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....16
4.1 Animais utilizados.....16
4.1.1 Caninos.....16
4.1.2 Hamsters.....17
4.2 Coleta de sangue de animal hígido (grupo controle saúde).....17
4.3 Coleta de sangue de animal infectado com *Leishmania infantum chagasi* (grupo controle doença).....17
4.4 Terapia fotodinâmica.....18
4.4.1 Aplicação da ftalocianina e incidência da luz visível.....18
4.4.2 Preparação das amostras dos grupos para inoculação.....20
4.5 Inoculação em hamster.....21
4.6 Análises laboratoriais.....21
4.6.1 Diagnóstico parasitológico: citopatológico.....22
4.6.2 Diagnóstico histológico.....22
4.6.3 Diagnóstico sorológico.....23
4.6.4 Diagnóstico molecular.....24
4.6.4.2 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....24
4.7 Análises estatísticas.....26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....27
5.1 Avaliação clínica.....27
5.2 Diagnóstico parasitológico: citopatológico.....28
5.3 Diagnóstico patológico.....29
5.3.1 Análise macroscópica.....29
5.3.2 Análise histológica.....30
5.4 Diagnóstico sorológico.....33

5.4.1 Teste de Aglutinação Direta..... 33

5.5 Diagnóstico molecular..... 35
5.5.1 PCR convencional..... 35

5.5.2 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)..... 37

6 CONCLUSÃO..... 44
7 BIBLIOGRAFIA..... 45
8 TRABALHO CIENTÍFICO..... 53
ANEXO A.....73
ANEXO B.....74
ANEXO C.....75

BECK, C. Efeito da luz visível associada à ftalocianina de cloro-alumínio na inativação da *Leishmania infantum chagasi* no sangue de cães. Botucatu, 2016, 88p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral é uma doença infecciosa, de caráter zoonótico, emergente e de notificação obrigatória. No Brasil tem como agente o protozoário *Leishmania infantum chagasi*, e o principal reservatório é o cão (*Canis familiaris*). A transfusão sanguínea é muito utilizada na rotina da clínica, entretanto está associada a transmissão de doenças infecciosas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com a luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino, quando inoculados em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Foram preparados 3 grupos experimentais compostos por 6 hamsters cada. O grupo controle recebeu sangue negativo para *Leishmania*, o grupo doença foi inoculado com sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* e o grupo tratamento recebeu sangue parasitado tratado com luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio. Os animais foram monitorados por 180 dias e então submetidos a avaliação clínica. Em seguida os animais foram anestesiados para a coleta de sangue por meio de punção intracardíaca e procedendo-se assim a eutanásia. O sangue foi colocado em microtubos e o soro separado por centrifugação e acondicionado a -30ºC, até a realização do teste de aglutinação direta. Após procedeu-se a coleta do fígado e baço para a realização da histopatologia. Outra parte destes órgãos e a medula óssea foram acondicionados em tubos livres de DNAse e RNAse, congelados a -30ºC até a realização da PCR e qPCR. Impressões do fígado e baço foram feitas em lâminas para a microscopia para verificar a presença das formas amastigotas do parasita. Após 180 dias os animais não apresentaram sinais clínicos e os exames sorológicos e parasitológicos foram negativos. Quanto ao exame macroscópico, alguns animais apresentaram hepato e esplenomegalia, já na análise histopatológica nenhum tecido analisado demonstrou formas amastigotas do parasita. Na avaliação da PCR o baço e a medula óssea de todos os hamsters, dos grupos doença e tratado, apresentaram amplificação da *Leishmania infantum chagasi.* Na qPCR ocorreu uma significativa diminuição ($P<0,01$) na parasitemia quando comparado ao grupo tratado com a luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio, com o grupo que recebeu sangue parasitado sem tratamento. Com esses resultados é possível concluir que a luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio reduz a parasitemia da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino.

Palavras-chave: canino, leishmaniose visceral, luz visível, ftalocianina de cloro-alumínio.

BECK, C. Effects of visible light associated with chloro-aluminium phthalocyanine on the inactivation of *Leishmania infantum chagasi* in dog blood. Botucatu, 2016, 88p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis is an emerging zoonotic infectious disease that requires mandatory reporting. In Brazil, it is caused by the protozoan *Leishmania infantum chagasi*, with dogs as main reservoir (*Canis familiaris*). Blood transfusion is frequently used in clinical routine, however it is associated with the transmission of infectious diseases. The aim of this study was to evaluate the effects of treatment with visible light associated with chloro-aluminium phthalocyanine on the inactivation of Leishmania infantum chagasi in canine blood, when inoculated in hamsters (*Mesocricetus auratus*). Three experimental groups consisted of six hamsters each. The control group received blood negative for *L. infantum chagasi*, the diseased group was inoculated with blood infected with *L. infantum chagasi*, and the treatment group received infected blood previously subjected to therapy with visible light associated with chloro-aluminium phthalocyanine. The animals were observed for 180 days and then subjected to clinical evaluation. Then the animals were anesthetized for blood collection through intracardiac puncture and were euthanized. The blood was placed into microtubes and the serum was separated by centrifugation and stored at -30 ° C until the direct agglutination test was performed. After, liver and spleen collection was performed to histopathological examination. Another part of these organs and bone marrow were placed in tubes DNase and RNase free, and frozen at -30°C until the PCR and qPCR were performed. Imprints of liver and spleen were performed on slides for microscopy to verify the presence of amastigotes of the parasites. After 180 days the animals showed no clinical signs and serologic and parasitological tests were negative. During pathological examination, some animals showed hepatomegaly and splenomegaly; under microscopic analysis, any tissue showed amastigote forms of the parasite. In the PCR evaluation of spleen and bone marrow, all hamsters from diseased and treated groups showed amplification of *Leishmania infantum chagasi.* Results from q-PCR revealed a significant decrease ($P < 0.01$) in the number of parasites in the group inoculated with blood subjected to chloro-aluminium photodynamic therapy, compared to the group inoculated with parasitized blood that had not been subjected to photodynamic therapy. With these results it is possible to conclude that visible light associated with chlorine-aluminum phthalocyanine reduces parasitaemia of Leishmania infantum chagasi in canine blood.

Keywords: canine, visceral leishmaniasis, visible light, chloro-aluminum phthalocyanine.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, zoonótica e de caráter emergente, amplamente distribuída em todo o mundo. No Brasil, esta parasitose ocorre principalmente nas regiões norte, sudeste e nordeste (BRASIL, 2012), porém, atualmente está distribuída em todo o território brasileiro (MARCONDES; ROSSI, 2013).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Calazar, é uma antropozoonose, causada no país, pela *Leishmania chagasi*, a qual já foi identificada no homem, cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores (IKEDA et al., 2010).

A transmissão ocorre entre os animais e o homem pela picada de flebotomíneos da espécia *Lutzomya longipalpis*. Já foi descrita a transmissão venérea, transplacentária e por transfusão sanguínea, sendo consideradas até o momento de pouca importância epidemiológica (MARCONDES; ROSSI, 2013). No entanto, Cardo et al. (2006), descreveram que a maioria das transmissões da LV ocorrem por transfusão sanguínea em áreas endêmicas.

A leishmaniose é considerada um grave problema de saúde pública, visto que acometem seres humanos atingindo crianças, adultos jovens e pessoas imunossuprimidas e, quando não tratada, pode apresentar letalidade de 95% (ALVES; BEVILACQUA, 2004). O Ministério da Saúde relatou 3.253 casos confirmados de Leishmaniose Visceral no Brasil, em seres humanos, no ano de 2013 (BRASIL, 2014).

A detecção de anticorpos anti-Leishmania utilizando técnicas sorodiagnósticas, constitui um instrumento essencial no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) (CIARAMELLA; CORONA, 2003), pois os animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-Leishmania.

As técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde, para o inquérito canino, são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Teste Imunoenzimático (ELISA) (BRASIL, 2006). A utilização do teste de aglutinação direta (DAT) no diagnóstico da LVC, também demonstra boa

sensibilidade comparado aos testes sorológicos (ELISA e RIFI), sendo uma prova simples e rápida de ser executada, não requerendo equipamentos sofisticados (FERREIRA et al., 2003).

Segundo Assis et al. (2008), a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser de grande valor no diagnóstico da leishmaniose, devido sua alta sensibilidade, confirmando casos inconclusivos.

Assim como outras doenças causadas por protozoários, não existe até o momento a cura parasitológica, apenas a remissão dos sinais, diminuição da carga parasitária, com consequente diminuição da capacidade de transmissão.

Atualmente, a terapia fotodinâmica é apresentada como uma alternativa para o tratamento da leishmaniose, porém, na forma cutânea (BASTOS, 2012), e sua ação já foi testada, *in vitro,* nas formas promastigotas de *Leishmania chagasi*. Embora a utilização da terapia fotodinâmica seja bem aceita, o uso contra microorganismos, pelo menos no caso de *Leishmania,* está ainda em estágio de experimentação (ESCOBAR et al. 2006).

Pesquisas estão sendo realizadas na inativação de patógenos do sangue utilizando terapia fotodinâmica. O tratamento com o uso da luz ultra-violeta associada à riboflavina e a luz visível associada à ftalocianina de cloro-alumínio, tem sido aplicado a microorganismos como *Leishmania infantum chagasi* e *Borrrelia anserina.*

O presente estudo teve como objetivo a avaliação da terapia fotodinâmica, utilizando luz visível associada à AlClPc, no sangue de cães infectados com *Leishmania infantum chagasi*, após 180 dias de inoculação em *hamsters* (*Mesocricetus auratus*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral Canina

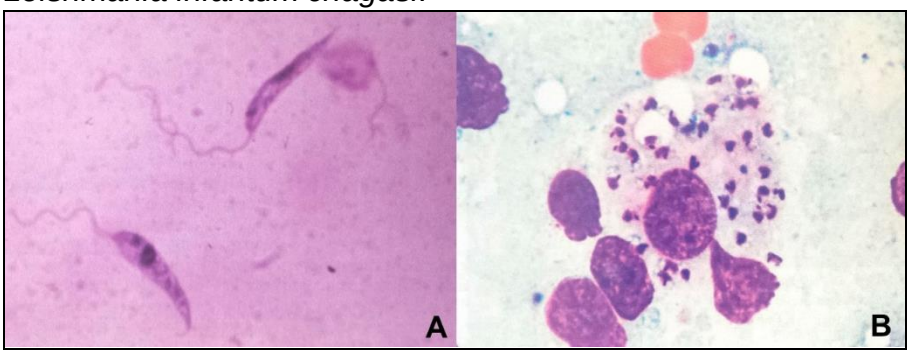
2.1.1 Etiologia e Patogenia

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania,* que acometem o homem e diferentes espécies de mamíferos das regiões tropicais e subtropicais. O agente etiológico da Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil é a espécie *Lesihmania (L.) chagasi* (TASCA et al., 2009).

Estes parasitas são transmitidos aos animais e ao homem pela picada de insetos pertencentes a ordem Diptera e família Psychodidae, denominados flebótomos do gênero *Lutzomyia longipalpis*. Nas Américas Central e do Sul, esta espécie constitui o único vetor eficiente na transmissão da Leishmaniose Visceral Canina (SILVA, 2007).

As leishmanias são organismos pleomórficos, ou seja, assumem duas formas evolutivas em seu ciclo de desenvolvimento. A forma promastigota, localizada no interior do intestino do hospedeiro invertebrado (intermediário), se caracteriza por ter um corpo alongado, com duas extremidades afiladas, um núcleo e um cinetoplasto anterior, do qual parte o axonema e então o flagelo. A forma amastigota, encontrada nas células do hospedeiro vertebrado (definitivo), tem aspecto ovalado ou esférico, com núcleo e cinetoplasto do qual parte o axonema, porém, sem flagelo (FORTES, 2004) (Figura 1).

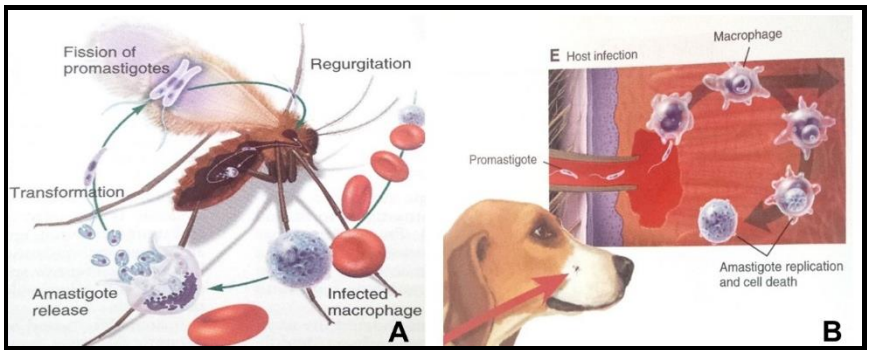
Figura 1- Formas promastigotas (A), e amastigotas em macrófago de canino (B) de *Leishmania infantum chagasi.*



Fonte: Greene, 2006.

Para ocorrer a inoculação do parasita, as fêmeas infectadas do mosquito realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberando as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto (Figura 2A). Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (Figura 2B). No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento deles, ocorrendo a liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo. Desta forma ocorre a disseminação via hematógena para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2006).

Figura 2- Ciclo evolutivo no hospedeiro invertebrado (A) e no hospedeiro vertebrado (B), demonstrando as formas amastigotas e promastigotas, no flebotomíneo e na corrente circulatória.



Fonte: Greene, 2006.

Nos países onde a LV é zoonótica, como é o caso do Brasil, os cães desempenham papel fundamental na epidemiologia do parasita em áreas urbanas, devido a sua relação e proximidade com o homem e ser o único reservatório doméstico (SILVA, 2007; QUEIRÓZ et al., 2010; FARIA; ANDRADE, 2012).

Ciaramella et al. (1997) citam que a pele dos cães é a região do corpo que mais manifesta os sinais clínicos, sendo o local onde acontece a primeira interação entre o parasita e o sistema imune deste hospedeiro, além de ser o local onde se encontram grandes quantidades de formas amastigotas deste parasita.

Por outro lado, Tafuri et al. (2001) descrevem que cães com sintomatologia típica de leishmaniose e com comprovada infecção por

Leishmania chagasi, podem apresentar ausência de formas amastigotas na pele, o que reduz a sua participação como fonte de infecção para outros insetos vetores.

Em áreas endêmicas, os cães podem ser encontrados clinicamente assintomáticos ou sintomáticos, sendo estes parâmetros clínicos muito discutidos quanto a constituição dos animais como fonte de infecção para os flebotomíneos (SILVA, 2007). Entretanto, já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fonte de infecção para os flebotomíneos e, consequentemente, têm papel ativo na transmissão da *Leishmania* (SOUZA et al., 2001).

A infecção em cães por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante à infecção humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais infectados e assintomáticos (Krauspenhar et al., 2007). Oliveira et al., (1993) relatam que é necessário um período de 2 a 12 meses para que um cão infectado desenvolva sinais clínicos, e o período de incubação observado em condições experimentais pode alcançar 25 meses. Brito et al. (2006), descrevem em cães sinais inespecíficos, como febre intermitente e duradoura, anemia, perda de peso progressiva e caquexia, frequentemente são encontrados.

Tabanez (2015) descreve que a evolução da doença em cães infectados é consequência da interação parasita hospedeiro, onde acredita-se que a programação genética do paciente dirija a resposta imune, tornando-o mais suscetível ou resistente à doença. Outros aspectos que influenciam, são fatores nutricionais, doenças concomitantes, imunossupressão, carga e cepa parasitária inoculada e resposta imunitária local.

Ramsey et al. (2010) acrescentam linfadenopatia generalizada, dermatite esfoliativa, alopecia periocular, hiperceratose do coxim plantar, crescimento exagerado das unhas, dermatites ulcerativas nodulares e claudicação. Brito et al. (2006) descrevem que a alopecia e ulcerações cutâneas ocorrem principalmente nas bordas das pinas, no focinho e nas margens palpebrais.

O parasita estimula resposta excessivamente ativa e ineficiente de células B, ao mesmo tempo em que suprime a ativação de macrófagos,

permitindo a propagação sistêmica dos parasitas diante da produção maciça de imunoglobulinas e complexos imunes (RAMSEY et al., 2010). A deposição ocorre, principalmente, na parede dos vasos na microcirculação, ativando a resposta do sistema complemento, atraindo mais células inflamatórias e lesionando o tecido (TABANEZ, 2015). Pode ocorrer envolvimento neurológico, epistaxe, doença hepática e conjuntivite (BRITO et al., 2006).

Feitosa et al. (2005) citam que existem contradições na literatura quanto à patogênese da leishmaniose visceral no sistema nervoso central, mas existem relatos da ocorrência da intensa deposição de antígenos de *Leishmania* e imunoglobulinas nos espaços intersticial e intravascular do plexo coroide de cães com esta doença.

2.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da LVC é muitas vezes um problema para o Médico Veterinário. Há um amplo espectro de sinais clínicos, desde animais aparentemente saudáveis, passando por oligossintomáticos, até estágios severos da doença. Uma característica importante é a permanência da doença em animais assintomáticos por longos períodos (GONTIJO; MELO, 2004).

Por ser uma doença de notificação compulsória, o diagnóstico da leishmaniose visceral deve ser feito da forma mais precisa possível, e para isso é importante que se conheça o método utilizado, suas limitações e sua interpretação clínica (FERRER, 1999; BRASIL, 2006). Existem basicamente três categorias de provas utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose visceral: os métodos parasitológicos, os métodos sorológicos e os métodos moleculares (FERRER, 1999).

A observação de formas amastigotas do parasita, de forma direta, poderá ser feita em esfregaços de aspirado de medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados com Giemsa, Leishman, Wrigth ou Panótico (LAURENTI, 2009; BRASIL, 2006). Apesar do exame parasitológico ser considerado o padrão ouro para o diagnóstico de LV, é um procedimento invasivo e requer uma infra-estrutura de média complexidade, médicos especialistas e técnicos de laboratório treinados. Para além das dificuldades

operacionais, a detecção de parasitas no aspirado de medula óssea, tem um fraco desempenho, com uma sensibilidade que varia entre 64% -77% (ASSIS; SANTANA, 2015).

A análise microscópica do linfonodo, baço, medula óssea, fígado, rim, pele e coração de cães, corados com hematoxilina e eosina (HE), apresentam reação linfohistioplasmocitária. Numerosos macrófagos reativos, contendo vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos com estruturas basofílicas sugestivas de formas amastigotas de *Leishmania,* foram observadas em medula óssea, fígado, baço e no linfonodo de cão. Nos órgãos linfoides, ocorre a proliferação linfoplasmohistiocitária, resultando na linfoadenomegalia generalizada (KRAUSPENHAR et al., 2007).

Trabalhos apontam a escolha dos testes sorológicos como de extrema importância para um bom inquérito epidemiológico. A RIFI é a técnica sorológica preconizada pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência, juntamente com o ELISA, por apresentarem alta sensibilidade e especificidade, baixo custo e fácil execução. Falhas na detecção da infecção por estes testes podem ocorrer nos animais que se apresentam no período de incubação da doença ou soroconversão (ALMEIDA et al., 2009). A RIFI demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro. Sendo assim, o ELISA é recomendado para triagem e o RIFI para confirmação (FARIA; ANDRADE, 2012).

Tasca et al. (2009) acrescentam que a sensibilidade e a especificidade do teste de ELISA dependem do tipo de antígeno empregado e de mudanças do protocolo experimental padrão. No entanto, Alves e Bevilacqua (2004), descrevem a utilização de antígenos recombinantes ou purificados como glicoproteínas de membrana específicas do gênero *Leishmania*, que melhoram a sensibilidade e a especificidade dessa técnica, porém, também podem ocorrer reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos.

Os métodos sorológicos são eficazes na detecção da leishmaniose ativa quando grandes quantidades de anticorpos específicos estão presentes (FISA et al., 2001). O ELISA é um teste sensível e permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (EVANS et al., 1990).

A RIFI é o exame sorológico mais utilizado no Brasil para o diagnóstico da LV. Do número total de casos de LV notificados entre 2007 e 2012, 86% (19.495) foram confirmados por critérios laboratoriais; destes, 53% (10.346) foram confirmadas por este método sorológico. Desta forma, a sua sensibilidade variou de 88%-92%, e a sua especificidade de 83%-88%. No entanto, semelhante às desvantagens de diagnóstico parasitológico, requer uma infra-estrutura complexa e técnicos treinados, limitando assim o acesso e retardando o diagnóstico e tratamento (ASSIS; SANTANA, 2015).

Como já afirmado, a especificidade do teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, como a Doença de Chagas e os da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A utilização de formas amastigotas de *L. (L.) donovani*, como antígeno na RIFI, aumenta significativamente a sensibilidade, sem perder a especificidade do teste, resultando em uma maior precocidade de diagnóstico em animais assintomáticos (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Lima et al. (2010), indicam o Teste de Aglutinação Direta (DAT) para o diagnóstico sorológico, pois essa parece ser uma ferramenta mais segura, por possuir maior sensibilidade e especificidade em relação à RIFI.

O teste de aglutinação direta é um dos testes mais simples e baratos usados para o diagnóstico da LV, muito utilizado nos países da África, Índia e Nepal, com sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100%. O antígeno, além de poder ser liofilizado, resiste a temperaturas elevadas. A técnica dispensa equipamentos, é realizada à temperatura ambiente e a interpretação do resultado é visual (PEDRAS; RABELLO, 2003).

Dentro deste cenário, o DAT com antígeno *L. (V.) braziliensis*, revelou 98% de sensibilidade e 84% de especificidade. O nível de especificidade obtido neste estudo, sugere que o DAT pode ser usado como diagnóstico para LTA, principalmente nas regiões onde se possa excluir a leishmaniose visceral e a doença de Chagas (SILVA, 2003).

Por outro lado, um levantamento realizado por Garcez et al. (1996), em cães de áreas endêmicas, o DAT e o ELISA foram menos sensíveis (ambos 71,4%) do que a RIFI (100%), utilizando antígeno de *L. (L.) donovani*. Dos soros analisados, 87% foram positivos para RIFI, mas somente 54% para ELISA e 49% para o DAT.

Safi e Evans (1989) citam que, após a confirmação do parasitológico, o ELISA e o DAT demonstraram ter a mesma sensibilidade e especificidade, sendo a grande vantagem da DAT a simplicidade para a realização e baixo custo quando comparado aos outros testes sorológicos.

Bezerra et al. (1996), realizaram um estudo da aplicabilidade do DAT em cães com leishmaniose cutânea, para o levantamento epidemiológico da infecção em cães. Esses autores, concluiram que o teste poderá ser usado na investigação da infecção por *Leishmania* para determinação de reservatórios da leishmaniose tegumentar, devido a sua facilidade de realização, bem como baixo custo.

Como esses testes não têm alta especificidade e falhas podem ocorrer, eles podem causar a eliminação de animais não infectados e por outro lado, não detectar casos positivos (FARIA; ANDRADE, 2012).

Laurenti (2009), acrescenta que os métodos sorológicos são muito empregados em inquéritos epidemiológicos, para a avaliação da prevalência da doença em áreas endêmicas, porém, os parâmetros de sensibilidade e especificidade das técnicas são de extrema importância para se evitar interpretações errôneas, com resultados falso positivos ou negativos, pois é um método indireto de medir a infecção.

Além do diagnóstico pelos exames sorológicos, existem técnicas de imunohistoquímica, que oferecem a vantagem de aumentar a sensibilidade e a especificidade das técnicas parasitológicas (TAFURI et al., 2001), sendo o baço um excelente órgão para a realização deste teste, devido ao intenso parasitismo. No baço ocorre reação inflamatória crônica e difusa, com macrófagos organizados em granulomas e repletos de formas amastigotas (XAVIER et al., 2006).

Moreira et al. (2007) demonstraram que o ELISA e a imunocitoquímica foram os testes mais eficientes para *Leishmania infantum chagasi*, em amostras de cães assintomáticos. Por outro lado, a identificação direta de parasitas pela coloração de Diff-Quick® e Imunofluorescência Direta foram mais eficientes em esfregaços de cães sintomáticos.

Na década de 90, foi introduzida uma técnica de imunocromatografia no diagnóstico imunológico, tendo como vantagem constituir um método rápido, com a facilidade e aplicabilidade em campo. Em alguns estudos realizados,

esse teste apresentou sensibilidade e especificidade bem variadas, de 72 a 96% e 61 a 100%, respectivamente, em dois estudos (FARIA; ANDRADE, 2012).

Como método molecular, a PCR tem sido muito útil no diagnóstico da LVC, em função da rapidez, sensibilidade e especificidade. A aplicação deste método atualmente tem provado que pode resolver os problemas diagnósticos que resultam da baixa sensibilidade do exame microscópico e os falsos positivos ou negativos dos exames sorológicos, geralmente atribuídos a anticorpos persistentes ou imunossupressão (IKONOMOPOULOS et al., 2003).

Esse teste pode ser realizado em diferentes amostras, tais como aspirados de medula óssea, de linfonodos, sangue, urina e biópsias de pele. A sensibilidade é bastante variável de acordo com a amostra utilizada na reação (FARIA; ANDRADE, 2012). Sacco (2013), em seu trabalho, encontrou 100% das amostras do baço de *hamsters* positivas na PCR, após 120 dias de inoculação de sangue de cão infectado com *Leishmania infantum chagasi*.

Segundo Assis et al. (2008), a PCR pode ter eficácia no diagnóstico da leishmaniose, confirmando casos positivos e inconclusivos. Trabalhos comprovaram que a PCR foi altamente eficiente para todas as manifestações clínicas de leishmaniose canina, incluindo cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (MOREIRA et al., 2007).

Outro método utilizado para diagnóstico da leishmaniose, é a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), que permite a quantificação dos parasitas, elucidando o *status* de cães positivos para a PCR convencional, especialmente em áreas endêmicas (FARIA; ANDRADE, 2012). Além disso, proporciona o monitoramento do número de parasitas durante e após o tratamento ou mesmo em triagens de quimioterápicos (FRANCINO et al. 2006).

Desde os anos 70, na China, foi utilizado para diagnóstico um método de isolamento de *Leishmania donovani*, por meio da inoculação de material suspeito em *hamsters*. A partir desse momento, este se constituiu um modelo para o isolamento e conservação *in vivo* desses parasitas (ROJAS; SCORSA, 1995).

O *hamster* é suscetível a várias espécies de *Leishmania*, sendo particularmente útil no estudo de leishmaniose visceral, por apresentar a maioria das alterações imunopatológicas características da leishmaniose

visceral humana (RIÇA CAPELLA et al., 2003). Awasthi et al. (2004) complementam que esse modelo é muito utilizado para estudos histopatológicos e para testes com medicamentos e vacinas.

De acordo com Souza et al. (2001), *hamsters* que foram inoculados com sangue infectado por *Leishmania chagasi*, desenvolveram sinais típicos da doença, incluindo ascite, caquexia e morte, além de alta carga parasitária no baço e no fígado, 90 dias pós transfusão.

2.2 Transfusão sanguínea

Grandes avanços têm ocorrido nas últimas décadas na área de transfusão sanguínea e hemoterapia na Medicina Veterinária. A escolha do doador, processamento e armazenamento adequado do sangue, reações transfusionais e a transmissão de agentes infecciosos, têm sido estudadas no decorrer dos anos (GIGER et al., 2002).

A transmissão de enfermidades infecciosas por meio da transfusão sanguínea é descrita por vários autores em Medicina Veterinária, sendo que a triagem dos doadores, para as principais doenças que podem ser veiculadas pelo sangue, é de extrema importância para não resultar em piora no quadro clínico do receptor (FREITAS et al., 2006).

Qualquer infecção por um agente que passe por uma fase sanguínea assintomática, tem o potencial de ser transmitida por via transfusional. As infecções parasitárias em seres humanos e animais que reúnem estas características, incluem a malária, a doença de Chagas, a tripanossomíase Africana, a leishmaniose, a toxoplasmose e a babesiose (PEREIRA et al., 2011).

A maior preocupação com os doadores caninos é a transmissão de protozoários, devido ao longo período de incubação, persistência subclínica em animais infectados e a probabilidade de permanecerem viáveis na bolsa de sangue. Relatos demonstram a transmissão de babesiose e leishmaniose durante transfusão sanguínea em cães (OWENS et al., 2001; FREITAS et al., 2006).

Sacco (2013), demonstrou em seu experimento, que o sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* não perdeu a capacidade de produzir a infecção após o período de armazenamento de 21 dias.

2.3 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) tem se destacado como uma das mais importantes técnicas médico-terapêuticas utilizadas no combate de doenças neoplásicas e não neoplásicas. Entre elas as doenças fúngicas, virais e bacterianas, degeneração macular da retina, psoríase, arteriosclerose, tratamento odontológicos e dermatológicos (ARIAS et al., 2007; TAYLOR et al., 2011; BASTOS et al., 2012), além da indicação no tratamento da leishmaniose (ISSA; AZULAY, 2010).

Essa modalidade terapêutica se baseia na combinação de três elementos fundamentais: agente fotossensibilizador, luz e oxigênio (TAYLOR et al., 2011; BASTOS et al., 2012). Dessa forma, envolve a ativação de substâncias fotossensíveis, fonte de luz e a geração de espécies citotóxicas de oxigênio e de radicais livres para promover a destruição de células alvo (ARIAS et al., 2007; ÇAMUR et al., 2011). A primeira observação de sensibilização química do tecido pela luz, foi descrita por Rabb, em 1900.

A combinação luz-fotossensibilizador-oxigênio pode ser considerada uma das técnicas mais bem sucedidas desenvolvidas nos últimos anos dentro do grande conjunto de terapias fotônicas já consolidadas (BASTOS et al., 2012). A terapia consiste em administração intravenosa, de um fotossensibilizador que se liga às lipoproteínas, de baixa densidade da corrente sanguínea. Esse fotossensibilizador é ativado com luz a um determinado comprimento de onda, convertendo o oxigênio molecular em espécies reativas, como oxigênio “singlete” e radicais livres, que reagem com os componentes celulares vitais, evoluindo para destruição celular seletiva (BASTOS et al., 2012).

Estão implicados múltiplos fatores na fototoxicidade ou fotodano da reação fotodinâmica, como: classe do fotossensibilizador, dose, via de administração, absorção, especificidade do corante e distribuição nas células

alvo, fonte de luz, intervalo entre administração do fotossensibilizador e a exposição (WIEDMANN; CACA, 2004).

Na destruição das células alvo, mediada por espécies citotóxicas de oxigênio e de radicais livres, estão envolvidos mecanismos diretos tais como apoptose e necrose, e indiretos, como a resposta imune e inflamatória (NAKASEKO et al., 2003).

No Brasil, o tratamento com a utilização de drogas da terapêutica humana ou drogas não registradas no Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), está proibido por meio da Portaria interministerial n° 1.426, de 11 de julho, do Ministério da Saúde e MAPA (WSPA-BRASIL, 2011).

Devido aos problemas enfrentados com a terapia disponível para a leishmaniose, como defeitos colaterais indesejáveis provocado pelos quimioterápicos e acessibilidade aos fármacos, alguns progressos foram observados no tratamento da leishmaniose cutânea. Além disso, pode-se observar um grande incentivo na descoberta e desenvolvimento de novas substâncias que promovam tratamentos melhores, mais simples e seguros (BASTOS et al., 2012).

2.3.1 Inativação com ftalocianina de cloro-alumínio associada à luz visível

Os agentes fotossensibilizadores são fundamentais para a fototerapia, já que deles depende a geração de espécies reativas de oxigênio, que são responsáveis pela morte de células tumorais ou infectadas por parasitas como *Leishmania* (TAYLOR et al., 2011).

Atualmente, as ftalocianinas que são pertencentes a segunda geração de fotossensibilizadores, têm sido utilizadas em TFD, tendo seu emprego clínico já aprovado (BROWN et al., 2004). São produtos altamente conjugados, de intensa pigmentação, utilizadas como corante sintético, destacando-se pela alta estabilidade térmica e química, sem toxicidade, atividade redox e caráter de condutividade bem definido (LEZNOFF; LEVER, 1989; FERREIRA et al., 2007).

A lipofilicidade contribui para a localização das ftalocianinas nas membranas plasmáticas, nos microssomos e nas mitocôndrias, para sua ação fotodinâmica (ROSENTHAL, 1991). Taylor et al. (2011), reforçam que a

ftalocianina tem maior excreção, o que minimiza os efeitos fotossensibilizantes prolongados, no entanto, apresentam depósito excessivo em órgãos como fígado, rins e baço.

As ftalocianinas pertencem a uma classe de compostos aromáticos unidas por átomos de nitrogênio. Como são estruturas com elevada conjugação eletrônica, apresentam absorção na região do visível (OLIVEIRA et al., 2015). É constituída por metal central que possui influência em sua propriedade fotossensibilizadora, com alta absorção na faixa de espectro luminoso vermelho (670-780nm) (ÇAMUR et al., 2011), onde a penetração tecidual da luz é maior.

A ftalocianina de alumínio tem ação direta sobre a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que cumpre um papel importante na progressão do ciclo celular induzido por mitógenos, na regulação do desenvolvimento embriogênico, do movimento celular e na apoptose (TAYLOR et al., 2011). Com sua utilização permitida na Rússia e na Índia, este fármaco mostrou-se eficiente no tratamento de tumores de coróide, olhos, pálpebra e sarcomas de bexiga (OLIVEIRA et al., 2015).

Dessa forma, as ftalocianinas possuem propriedades fotofísicas vantajosas e diversos estudos demonstram seu potencial para a TFD (ZHU et al., 2006). Oliveira et al. (2015) acrescentam que esses compostos também podem ser aplicados como biomarcadores fluorescentes para proteínas e anticorpos.

Escobar et al. (2006), cita que formas promastigotas de *Leishmania chagasi* foram altamente suscetíveis à terapia fotodinâmica *in vitro* utilizando tratamento com ftalocianina de alumínio (AlPc) e iluminação de luz vermelha a 670 nm. Este fotossensibilizador mostrou um efeito citotóxico mais elevado do que ftalocianina de zinco (ZnPc).

Devido à importância sanitária e potencial zoonótico, estudos que promovem formas de inativação da *Leishmania infantum chagasi* são de extrema importância, uma vez que não foram encontrados trabalhos *in vivo* na literatura compilada com terapia de luz visível associada a AlClPc.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com a luz visível associada à ftalocianina de cloro-alumínio na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino, inoculado em *hamster*.

3.2 Específico

Em *hamsters* tratados com luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio e não tratados buscou-se:

Verificar a presença de formas amastigotas da *Leishmania infantum chagasi* no fígado e baço através da microscopia óptica.

Avaliar as alterações histopatológicas no fígado e baço.

Verificar no soro a positividade da *Leishmania infantum chagasi* pelo teste de aglutinação direta.

Analisar por meio da PCR e quantificar a carga parasitária pela qPCR no baço, fígado e medula óssea.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal da UNESP-Botucatu, recebendo parecer favorável, seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de experimentação Animal (COBEA), sob o número do protocolo 40/2014 (Anexo A) e 42/2014 (Anexo B). O projeto segue a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008).

4.1 Animais utilizados

Os animais utilizados para o referido estudo foram dois cães, um hígido e outro naturalmente infectado por *Leishmania Infantum chagasi*, e 18 *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) para a inoculação, sendo divididos em três grupos para o experimento.

4.1.1 Caninos

No primeiro momento, foram utilizados dois caninos fêmeas. Um da raça Golden Retriever, hígido, com cinco anos de idade, e outro, da mesma raça, com dois anos de idade, naturalmente infectado com *Leishmania infantum chagasi.* Os sinais apresentados pelo canino parasitado foram emagrecimento, alopecia e crostas na região periorbital, além de úlcera crostosa na orelha. O cão foi diagnosticado com leishmaniose visceral por meio de exame parasitológico (punção aspirativa do linfonodo pré-escapular) (Anexo C).

O canino hígido foi escolhido aleatoriamente da raça Golden Retriever, adulto, peso aproximado de 25 kg, de região não endêmica no interior do Estado do Rio Grande do Sul (Ijuí-RS), com exame clínico e hemograma normais. Foi realizada a coleta de 4 mL de sangue, por meio de punção da veia safena, após tricotomia e antissepsia. O material foi acondicionado em um tubo com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e encaminhado em recipiente com gelo, ao Laboratório de Imunodiagnóstico e Biologia Molecular – Zoonoses da

UNESP-Botucatu, para a realização do método da qPCR. O resultado da amostra foi negativa para a pesquisa de *Leishmania infantum chagasi.*

4.1.2 Hamsters

Foram utilizados 18 *hamsters* dourados (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, adquiridos do Biotério de Criação Anilab Campinas/SP, com dois meses de idade e peso médio de 90 gramas para a realização da inoculação do sangue canino.

4.2 Coleta de sangue de animal hígido (grupo controle saúde)

Após a confirmação do exame negativo para leishmaniose do canino hígido, foi realizada tricotomia e antissepsia da região cervical e coletado 450 mL de sangue da veia jugular em uma bolsa específica[1], contendo CPDA-1 (anticoagulante citrato fosfato dextrose), que ficou armazenada sob refrigeração por dois dias.

4.3 Coleta de sangue de animal infectado com Leishmania infantum chagasi (grupo controle doença)

Foi utilizado um canino, fêmea, com dois anos de idade, da raça Golden Retriever, oriundo do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba-SP, em que foi realizado o exame parasitológico para a pesquisa da *Leishmania infantum chagasi*, por meio da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de linfonodo pré-escapular. No resultado, foram observadas formas amastigotas típicas de *Leishmania infantum chagasi*.

Com o teste positivo, foi realizada a coleta de 450 mL de sangue do canino infectado em uma bolsa específica[1] contendo CPDA-1, com o protocolo pré-anestésico de 0,055 $mg.Kg^{-1}$ de acepromazina[2] 0,2%, intravenosa (IV),

[1] Bolsa de coleta de sangue simples 500 mL, JP Indústria Farmacêutica S/A, Ribeirão Preto-SP.
[2] Vetnil- Louveira-SP

seguida de uma indução e manutenção anestésica de tiopental sódico[3] (15 mg.Kg^{-1} IV). O canino foi submetido à eutanásia, ainda em plano anestésico, por meio da aplicação de uma ampola de cloreto de potássio[4] a 19,1%, pela via intravenosa, conforme Decreto nº 51.838 do Senado Federal, 14 de março de 1963, que estabelece que "animais portadores de leishmaniose devem ser submetidos à eutanásia". O método de eutanásia segue as recomendações da Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

A bolsa com sangue foi acondicionada em recipiente térmico com gelo e enviada imediatamente ao Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, e Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina da Universidade de São Paulo - FFCLRP, Campus da USP de Ribeirão Preto – SP, para dar continuidade ao experimento, sob a orientação do Dr. Antônio Cláudio Tedesco.

4.4 Terapia fotodinâmica

4.4.1 Aplicação da AlClPc e incidência da luz visível

No laboratório do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, da USP-Ribeirão Preto, o material foi preparado com seringas de 3 e 5 mL[5], agulhas tamanho 25x7[2]mm, placas de meio de cultura celular, homogeinizador, pipetas, ponteiras e tubos de ensaio. Realizada a desinfecção, foram colocados em uma capela de fluxo laminar para o preparo das amostras.

O espectro de absorção da nanoemulsão contendo ftalocianina de cloro- alumínio 45,89 µM.L^{-1} (Figura 3), foi determinado para a preparação do fotossensibilizador. Os valores de tamanho, polidispersão e potencial eletrônico da nanoemulsão vazia (Tabela 1) e da AlClPc (Tabela 2) foram verificadas, observando-se que a maior absorvância de luz da AlClPc se deu no comprimento de onda entre 650-700 nm, aproximadamente. Posteriormente, a AlClPc foi processada para o procedimento.

[3] Cristália, São Paulo-SP
[4] Isofarma- Eusébio-CE
[5] Descarpack- Ilhota-SC.

Figura 3- Espectro de absorção da nanoemulsão contendo ftalocianina de cloro-alumínio 45,89 µM.L^{-1}.

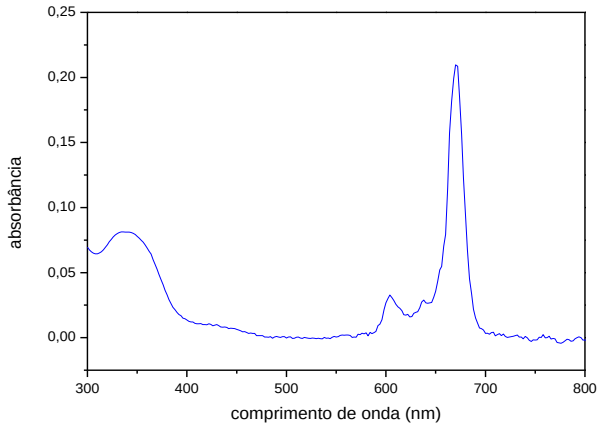


Tabela 1- Valores de tamanho, polidispersão e potencial eletrônico da nanoemulsão vazia.

Data	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial eletrônico (mV)
08/09/14	228,2	0,296	-51,5
28/10/14	224,8	0,282	-52,1

Tabela 2- Valores de tamanho, polidispersão e potencial eletrônico da nanoemulsão com ftalocianina de cloro-alumínio.

Data	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial eletrônico (mV)
08/09/14	211,7	0,215	-52,5
28/10/14	218	0,245	-53,7

A incidência da luz foi realizada por meio de um dispositivo com o sistema BTH Quantum Tech. Este sistema de luz é contínuo (CW), com uma potência total na fibra óptica ao redor 0,3 W e comprimento de onda na faixa do visível (de 630 a 650 nm).

O cálculo da dose e potência, bem como o tempo de irradiação sobre a área de incidência, foi realizado de acordo com o tamanho da placa de cultivo e a área a ser incidida pela luz (Tabela 3).

Tabela 3- Medidas obtidas da luz visível de acordo com a área a ser incidida na placa contendo sangue parasitado.

Medidas	Resultado
Área de irradiação (cm^2)	1,5
Comprimento de onda (nm)	630
Dose (J/cm^2)	50
Potência (mW)	136
Tempo de irradiação (min)	11

Após a organização do material, as amostras foram manipuladas de acordo com grupos pré-definidos.

4.4.2 Preparação das amostras dos grupos para inoculação

Os grupos de amostras (*in vitro*) foram preparados de forma que fossem organizadas em três grupos, citados na Tabela 4. Todo o processo foi realizado em fluxo laminar, com material estéril.

Tabela 4- Grupos utilizados com o respectivo tratamento.

Grupos	Tratamento
Grupo 1 (grupo saúde)	Foram utilizados 21 mL de sangue canino negativo para *Leishmania infantum chagasi*. Este volume foi dividido em 12 poços de 1,5 cm de diâmetro, em uma placa de cultivo celular, constituída por 24 poços, contendo 1,75 mL de sangue em cada. Imediatamente após, a placa foi mantida sobre um homogeinizador por 11 minutos.
Grupo 2 (grupo doença)	Foram aspirados 21 mL de sangue canino de uma bolsa positiva para *Leishmania infantum chagasi*, e distribuídos em 12 poços em placa de cultivo celular do mesmo tamanho do grupo 1, sendo que em cada poço permaneceu com um volume de 1,75 mL do sangue. A placa foi mantida sobre um homogeinizador pelo mesmo tempo.
Grupo 3 (grupo tratamento)	Foram colocados 1,75 mL de sangue canino positivo para *Leishmania infantum chagasi* e adicionado 191 µl de ALClPc na concentração 45,84 µM (concentração final de 5 µM da solução), sendo então distribuídas em 12 poços de 1,5 cm de diâmetro, no mesmo tipo de placa de cultivo celular dos grupos anteriores, totalizando 21 mL de sangue e 2,3 mL de nanoemulsão. A partir daí a placa foi colocada sobre um homogeinizador e, em seguida, incidida uma luz visível num comprimento de onda de 630 nm, em uma potência de 136mW, na dose de $50J/cm^2$ durante 11 min.

4.5 Inoculação em hamster

Após o processo da preparação das amostras dos diferentes grupos, estas foram inoculadas nos *hamsters*. Cada animal recebeu 3,5 mL de sangue via intraperitoneal (FREITAS et al., 2006), dos diferentes tratamentos, sendo que cada grupo possuía seis animais, totalizando 18 *hamsters*.

Realizada a inoculação, os *hamsters* foram colocados em caixas de experimento de propileno tamanho 41x34x16cm, contendo maravalha de *Pinus* sp esterilizada, com tampa, separados por grupos, sendo três animais por caixa. Os animais forma alimentados com ração comercial para a espécie (Puro Lab 22PB[6]) e água *ad libitum* e foram diariamente observados no horário da alimentação. A troca de maravalha era realizada duas vezes por semana e, nesse momento, era realizado o exame clínico.

Todos os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUÍ, em ambiente climatizado, na temperatura média de 22ºC, durante 180 dias, sendo feita a eutanásia em um animal de cada grupo aos 90 dias após inoculação.

4.6 Testes diagnósticos

Aos 90 dias de experimento, foram realizadas eutanásias em três animais, um de cada grupo, para a coleta de material, com o objetivo de acompanhar além da observação clínica, o reflexo da inoculação do sangue parasitado com a *Leishmania infantum chagasi*, e do sangue que recebeu o tratamento da luz visível associado à AlClPc, neste período de tempo.

Os *hamsters* foram anestesiados com associação de quetamina[7] (200mg.kg-1) e xilazina[8] (10mg.kg-1), pela via intraperitoneal, seguindo o protocolo de Faria Neto e Santos (2008). Logo após o efeito do plano anestésico, foi realizada a exsanguinação por meio de punção intracardíaca, seguindo o método de eutanásia descrito por Silva e Bessa (2008). O sangue

[6] Puro Trato. Santo Augusto-RS
[7] Syntec, Santana de Parnaíba-SP
[8] Syntec, Santana de Parnaíba-SP

foi acondiconados em microtubos®[9] e o sangue foi centrifugado a 4000rpm, por cinco minutos, para obtenção do soro e posterior congelamento a -30ºC.

A seguir, procedeu-se a coleta do fígado, baço e medula óssea. Impressões de fragmentos do fígado e baço foram realizadas em lâminas de microscopia e coradas com Diff Quick. Após, parte desses tecidos foram acondicionados em um frasco contendo formalina tamponada 7,5%, para a posterior realização de exame histológico. O restante dos fragmentos destes órgãos e a medula óssea foram acondicionados em microtubos livres de DNAse e RNAse®[10] e congelados a -30°C.

As amostras de soro e os fragmentos de tecido foram enviados ao Laboratório de Imunodiagnóstico e Biologia Molecular – Zoonoses da UNESP-Botucatu, para realização do Teste de Aglutinação Direta, PCR e qPCR. Para análise histológica, os órgãos foram encaminhados ao Laboratório de Patologia da Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul - UNIJUÍ.

Passados 180 dias da inoculação, foi realizada a eutanásia, coleta de sangue e órgãos de todos os *hamsters* (cinco de cada grupo), e os materiais encaminhados aos laboratórios seguindo o mesmo procedimento dos 90 dias.

4.6.1 Diagnóstico parasitológico: citopatológico

O baço e fígado foram utilizados para a realização do diagnóstico citopatológico, por meio da confecção de lâminas pela aposição de tecido (*imprint*) e coradas utilizando corantes do tipo Romanoswski. A pesquisa das formas amastigotas de *Leishmania* foi realizada de acordo com Laurenti (2009).

4.6.2 Diagnóstico histológico

Os fragmentos foram fixados em solução de formol a 7,5% tamponada, armazenado por, no mínimo, 48 horas, para processamento histológico de rotina. Os fragmentos passaram por diferentes banhos que incluíram: álcool,

[9] Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo-SP.
[10] Kasvi, Curitiba-PR.

xilol e, ao final, parafina, em um processador de tecidos Lupetec PT 05®[11]. Na sequência, os fragmentos foram colocados em bloco de parafina para serem cortados na espessura de 3-4 µm e posteriormente corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Em seguida, o material foi analisado em microscópico ótico em aumento de 100 e 400x.

4.6.3 Diagnóstico sorológico

As amostras de sangue coletadas pela punção intracardíaca foram colocadas em tubos e imediatamente centrifugadas a 4500rpm por cinco minutos e o soro congelado a -30°C, posteriormente, enviadas ao laboratório para a realização do teste de aglutinação direta.

4.6.3.1 Teste de Aglutinação Direta

O antígeno foi produzido pelo Laboratório de Imunodiagnóstico e Biologia Molecular – Zoonoses, no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP, Botucatu, cultivando formas promastigotas de *L. major*, por sete dias em meio NNN (Neal, Novy, Nicolle) e LIT (***L****iver* ***I****nfusion* ***T****riptose*). Os parasitas foram centrifugados a 4000g a 4ºC por 15 minutos. Em seguida, o *pellet* foi lavado cinco vezes por centrifugação e ressuspensão (3200g, 4ºC, 10 minutos) em solução de *Locke* gelada (mantida a 4ºC), sendo então pesado o *pellet*. Foi adicionada solução de *Locke* 0,4% de tripsina, e mantida a essa proporção de 19 vezes o volume inicial de *pellet*.

O antígeno foi incubado por 45 minutos a 37ºC. Então, foi lavado novamente com a solução Locke por cinco vezes e realizada a ressuspensão até obter uma concentração de $2x10^8$ /mL do parasita. Foi adicionado igual volume de formaldeído 2% em solução de Locke de maneira a se obter a concentração final de 10^8 promastigotas/mL. A solução foi incubada *overnight* por 16 horas a 4ºC e então lavada duas vezes com solução fisiológica gelada (3200g a 4ºC por 10 minutos). Adicionou-se 0,02 de azul de comassiê, diluído em solução fisiológica por 90 minutos, sob agitação lenta. As promastigotas

[11] Lupetec, São Carlos-SP.

foram então lavadas mais duas vezes com solução fisiológica gelada, de maneira a ressuspender o *pellet* e obter uma concentração final de 10^8 promastigotas/ml, em solução fisiológica contendo formalina 1%. O antígeno foi estocado a 4ºC, até o uso.

O soro dos *hamsters* foi diluído de forma que recebeu um tratamento com 2-mercaptoetanol 20M, e com solução fisiológica com SFB (soro fetal bovino) 1%. Foram preparadas diluições de 1:20 a 1:520 e, em seguida, as amostras foram incubadas a 37ºC por uma hora. Adicionou-se um volume igual (50 µl) em cada poço e mantidos *overnight* por 16 horas na temperatura ambiente. A leitura final foi realizada, estimando-se a diluição onde há o ponto azul claro idêntico ao observado no controle (com saliva e antígeno).

4.6.4 Diagnóstico molecular

4.6.4.1 PCR convencional

Os *primers* utilizados para a PCR convencional foram:

- 150: 5′ GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3′
- 152: (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T) TTACACCAACCCC 3′

O perfil de ciclagem foi realizado primeiramente com a desnaturação inicial à temperatura de 95ºC por cinco minutos, seguidos da execução de 29 ciclos realizados a 95ºC por um minuto; 55ºC por 30 segundos e 72ºC por 10 segundos. A extensão final foi utilizada a temperatura de 72ºC por cinco minutos.

4.6.4.2 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

A extração de DNA foi realizada com o Kit Illustra Tissue® & Cells Genomic Prep Mini Spin®[12], no laboratório de Imunodiagnóstico e Biologia Molecular-Zoonoses da FMVZ-UNESP, Botucatu, com algumas adaptações previamente padronizadas. A extração foi realizada a partir de 50 mg de amostras de tecido dos *hamsters* (baço, fígado e medula óssea), seccionados em pequenos fragmentos com lâminas para bisturi estéreis. Foi adicionado

[12] GE HealthCare, EUA

1mL de solução salina tamponada em fosfatos (PBS-*phosphate buffered saline*) 7,2pH. Centrifugou-se a 12600g por um minuto. O sobrenadante foi descartado com auxílio de pipeta, adicionado 50µL de PBS e o conteúdo foi homogeneizado por um minuto com o Biovortexer. Adicionou-se 50 µL de solução de lise 1, e 10 µL de proteinase K (20mg/mL). Agitou-se em vórtex[13] por 15 segundos. Incubou-se a 56ºC por uma hora em banho-maria, seguido da adição de 500 µL de solução de lise 4. Agitou-se novamente, em vórtex, por 15 segundos. Incubou à temperatura ambiente, sob agitação, por 10 minutos. Toda a amostra foi aplicada na coluna do tubo coletor. Centrifugou-se a 10400g durante um minuto. O líquido do tubo coletor foi desprezado e, em seguida, adicionou-se 500 µL da solução de lise 4. Centrifugou-se a 10400g durante um minuto. O líquido do tubo coletor foi desprezado. Adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem. Centrifugou-se a 10400g durante três minutos. A coluna foi transferida para microtubo de 1,5 mL livre de DNAse e RNAse. Adicionou-se 200 µL de tampão de eluição a 70ºC. Foi esperado um minuto e centrifugou-se por 10400g por um minuto. Após esta etapa, o DNA extraído foi mantido a 4ºC para estabilização e, posteriormente, congelado a -20ºC.

A *leishmania major* foi útil como controle positivo, cultivadas em meios LIT e NNN, as quais foram contabilizadas em câmara de Neubauer, obtendo 1,4. 10^7 parasitas/mL. Esse controle foi extraído e diluído nas proporções 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}.

As amostras foram submetidas a PCR quantitativa em tempo real, realizadas em duplicata, utilizando o sistema SYBR®Green, com o programa StepOneTM Plus Real Time PCR System equipment (Applied Biosystem®, Foster City, Califórnia, USA) (Figura 4) e foram utilizados *primers* descritos por Passos et al. (1999), que correspondem a 150: 5′ GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3′ e 152: 5′ (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T) TTACACCAACCCC 3′. O volume final do ensaio foi de 20 µL, constituiu de 10 µL de Power Syber®Green PCR master Mix (Applied Biosystems®, Foster City, California, USA), 0,2 µL de cada *primer* (10pmol), 2 µL de DNA e 7,6 µL de água ultra-pura. As seguintes condições foram utilizadas: 95ºC por 10 minutos, 40 ciclos de 95ºC por 15 segundos,

[13] IKA', Campinas – São Paulo

60ºC por um minuto e uma etapa para a curva de dissociação de 55 minutos (60ºC a 95ºC). Os sinais fluorescentes foram obtidos durante a etapa de ciclos de amplificação. Além das curvas de amplificação, as curvas de dissociação (*melting curve*) também foram analisadas.

Figura 4- Aparelho Applied Biosystem® utilizado para a realização da qPCR. Fonte: Beck, 2015



4.7 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos a análise da estatística descritiva e da variância (ANOVA). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 tratamentos (grupo saúde, grupo doença e grupo tratado) com 5 repetições e teste de médias por Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para estas análises foi empregado o software GENES (CRUZ, 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação clínica

Os *hamsters* do grupo que foi inoculado com o sangue infectado com a *Leishmania infantum chagasi*, e do grupo que recebeu o sangue tratado com luz visível associada a AlClPc, não apresentaram nenhum dos sinais clínicos associados a infecção parasitária como emagrecimento, lesões cutâneas ou ascite até os 180 dias em que foram observados. Apesar de *hamsters* serem um modelo ideal para a replicação da leishmaniose, segundo Souza et al. (2001), nem sempre ocorre a demonstração de sinais clínicos.

Por outro lado, Oliveira et al. (1993) relataram que se faz necessário um período de 2 a 12 meses para que um cão infectado desenvolva sinais clínicos, e o período de incubação observado em condições experimentais pode alcançar até 25 meses, o que pode ter ocorrido neste caso, já que os *hamsters* mimetizam a enfermidade da espécie canina.

Ao contrário do presente trabalho, Sacco (2013), que também desenvolveu em seu experimento a inoculação de sangue positivo para *Leishmania* em *hamsters*, e encontrou sinais de emagrecimento aparente após 120 dias de inoculação. No entanto, observou que o grupo de *hamsters* que recebeu sangue tratado por terapia fotodinâmica (luz ultravioleta associada à riboflavina), após o mesmo período, não apresentou sinais clínicos evidentes da infecção pelo parasita.

Como já constatado por Awasthi et al. (2004), a resposta imune anti-leishmania demonstra ser dependente do genótipo do hospedeiro de modo que algumas linhagens puras de rato são suscetíveis enquanto outras são resistentes. A resistência é conferida pelas células T-helper tipo 1 (Th1) enquanto a susceptibilidade é conferida por células Th2.

As células T desempenham papel central na imunidade pela produção de citocinas e a interação com macrófagos infectados. Trabalhos demonstraram que cães cronicamente infectados com leishmaniose

apresentaram menor número de células T, bem como a redução da função, quando comparados com cães não infectados (ROSYPAL, 2005).

As células Th1 secretam IL-2 e IFN-δ, porém Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-10. Desta forma, tem sido demonstrado que o IFN-δ ativa macrófagos para expressar iNOS2 (oxido nítrico sintase induzível), enzima que catalisa a formação de óxido nítrico, que destrói as amastigotas intracelulares (AWASTHI et al., 2004).

5.2 Diagnóstico parasitológico: citopatológico

Neste trabalho no que diz respeito a possibilidade de recuperação das formas amastigotas, tanto no interior das células, bem como para fora delas aos 180 dias logo depois da inoculação, por conta disso considerou-se negativa. Esses resultados reproduzem os encontrados por Laurenti (2009).

De fato, a especificidade desse método é de 100%, mas a sensibilidade depende do grau do parasitismo, do tipo de material biológico, da forma do processamento e coloração, além do observador. A sensibilidade pode ser de 60% em amostras de medula óssea, e menos de 30% de linfonodo (FERRER, 1999).

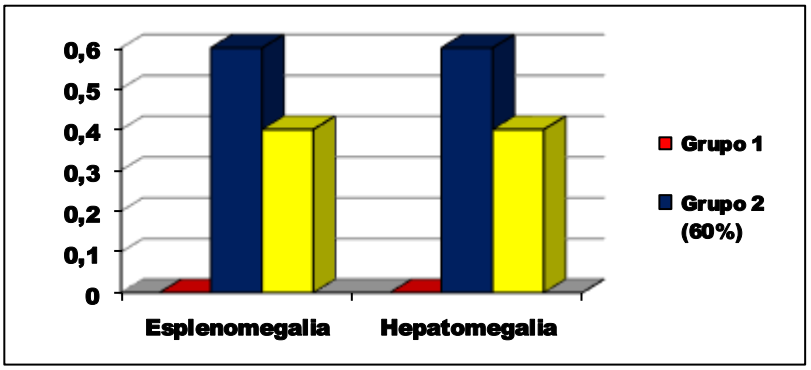
Laurenti (2009) afirma que quando o parasitismo é intenso não há problemas para um diagnóstico rápido e seguro; no entanto, em animais assintomáticos, poucas formas amastigotas estão presentes nos tecidos, tornando o diagnóstico parasitológico difícil e duvidoso. Como neste estudo os animais não apresentaram sinais clínicos até a coleta de órgãos, pode ter ocorrido pouco parasitismo nos tecidos, dificultando o diagnóstico por este método.

5.3 Diagnóstico patológico

5.3.1 Análise macroscópica

O baço e o fígado foram analisados macroscopicamente aos 90 dias após inoculação, e não apresentaram alterações de aumento de tamanho ou cor, comparando o grupo controle com os demais. No entanto, após 180 dias de inoculação, em alguns casos, os animais apresentaram alterações como esplenomegalia e hepatomegalia (Figura 5). Stanley e Engwerda (2007) descrevem que a esplenomegalia é uma das alterações relevantes na leishmaniose.

Figura 5. Apresentação do percentual de órgãos com alterações macroscópicas dos grupos.



Martins et al. (2015), identificaram em cães naturalmente infectados e sintomáticos, esplenomegalia com espessamento das bordas, aspecto rugoso e irregular da superfície e coloração vermelho escura, sugerindo um quadro de congestão.

Nos órgãos examinados, foi observado na maioria do grupo doença a esplenomegalia, sendo que também o baço se encontrava rugoso e de superfície irregular, além da coloração mais escura, comparado com o grupo saúde. Sacco (2013) em seu experimento percebeu que após 120 dias de inoculação do sangue infectado com *Leishmania*, os *hamsters* apresentaram hepato e esplenomegalia.

Romão (2008) descreveu em seu trabalho, que *hamsters* inoculados no coxim plantar com diferentes cepas de *Leishmania (V.) braziliensis*

apresentaram patogenicidade e infectividade distintas, além de demostrarem capacidade de visceralização em linfonodo, fígado e baço. Percebeu que após 120 dias de inoculação, três animais dos 12 analisados, apresentaram alterações macroscópicas de baço, com nódulos de aspecto caseoso ao corte.

5.3.2 Análise histológica

Exames histológicos do baço e fígado foram realizados após 90 e 180 dias de inoculação, afim de verificar a presença ou não de formas amastigotas de Leishmania e as possíveis alterações, de acordo com os grupos saúde, doença e tratado com a luz visível associada a AlClPc. Apesar dos cortes de tecido não apresentarem formas amastigotas, foram percebidas algumas variações nas amostras, descritas na Tabela 5 e 6.

Tabela 5 - Resultados dos exames microscópicos do baço e fígado nos diferentes grupos após 90 dias de inoculação em *hamsters*.

Grupos	Baço	Fígado
Saúde	Raros macrófagos com citoplasma espumoso em área subcapsular.	Infiltrado inflamatório leve, composto por macrófagos e alguns linfócitos distribuído de forma multifocal e aleatória; área focal de vacuolização do citoplasma de hepatócitos.
Doença	Sem alterações.	Infiltrado inflamatório leve multifocal aleatório composto de macrófagos e alguns linfócitos.
Tratamento	Sem alterações.	Infiltrado inflamatório leve multifocal aleatório composto de macrófagos e alguns linfócitos.

Tabela 6 - Resultados dos exames microscópicos do baço e fígado nos diferentes grupos após 180 dias de inoculação.

Grupos	Baço	Fígado
Saúde	Congestão multifocal moderada a difusa, hemossiderose discreta a multifocal	Congestão multifocal moderada. Infiltrado multifocal leve mononuclear (plasmócito, macrófago, linfócito).
Doença	Congestão difusa acentuada	Infiltrado de macrófagos, multifocal moderado, raros linfócitos, congestão multifocal moderada
Tratamento	Congestão difusa acentuada	Congestão multifocal de leve a acentuada. Infiltrado leve a moderado de macrófagos multifocal aleatório

Aos 180 dias, o baço demonstrou sinais de congestão na histopatologia, o que não ocorreu aos 90 dias, alteração que já havia sido evidenciada na análise macroscópica.

De acordo com Stanley e Engwerda (2007), o baço é um local inicial para a geração de respostas imunitárias mediadas por células, mas torna-se um sítio de permanência do parasita associadas a alterações imunopatológicas, que incluem esplenomegalia e uma quebra na arquitetura do tecido, contribuindo para o estado imunocomprometido do hospedeiro.

Nesse caso não foram observados parasitas após 6 meses de inoculação, o que, de acordo com Santana et al. (2008), não descarta o diagnóstico de leishmaniose, pois o exame histopatológico do baço, apresentou uma sensibilidade de 14% em um grupo de 72 cães infectados. Por outro lado, Moreira et al. (2007), na análise desse órgão, perceberam 38,13% de sensibilidade para cães assintomáticos. Segundo Santana et al. (2008), a distribuição parasitária no baço é geralmente irregular, podendo ser uma justificativa das amostras negativas do presente trabalho.

Martins et al. (2015) descrevem que os animais sintomáticos apresentaram uma maior deposição de colágeno e fibrogênese intensa no baço, que pode estar associada ao maior parasitismo tecidual encontrado e à processos degenerativos decorrentes da doença. Esses resultados não foram vistos nos órgãos analisados dos *hamsters*, provavelmente por serem animais assintomáticos.

Ainda de acordo com Martins et al. (2015), as alterações histopatológicas observadas no baço de cães são o espessamento e inflamação da cápsula, a hiperplasia e hipertrofia da polpa branca e da vermelha, tanto nos animais sintomáticos como nos assintomáticos. O autor descreve que, em alguns casos, foram encontradas congestão da polpa vermelha, deposição de pigmentos de hemossiderina e depleção da bainha periarteriolar na polpa branca.

Tasca et al. (2009) complementaram em seu trabalho, que realizando análise histopatológica em tecidos esplênicos de cães sintomáticos naturalmente infectados com *L. infantum chagasi,* observou-se aumento de macrófagos, plasmócitos e células gigantes, além de intensa proliferação de linfócitos, extensas áreas hemorrágicas e algumas necrosadas. Em alguns cães foi demonstrado que o tecido encontrava-se completamente desestruturado, sem separação nítida da polpa vermelha da branca, com intensa infiltração de macrófagos infectados. Contudo, no presente estudo, apenas a congestão difusa acentuada, sem presença de formas amastigotas de *Leishmania*, foi observada.

As amostras de tecido hepático analisadas aos 90 dias demonstraram um quadro inflamatório e, aos 180 dias, sinais de congestão e infiltrados de células de defesa, porém sem a inclusão de formas amastigotas de *Leishmania*. Moreira et al. (2007) descrevem que o exame histopatológico realizado em amostras de fígado corados com HE, revelaram sensibilidade de 13,04%. Isto contribui para explicar o resultado negativo obtido nas amostras do presente estudo.

Romão (2008) descreve que no fígado observam-se infiltrados inflamatórios focais contendo macrófagos, eosinófilos e linfócitos e alguns macrófagos que exibem inclusões citoplasmáticas sugestivas de *Leishmania*. Apesar de não terem sido observadas inclusões de amastigotas, foi detectada a presença de infiltrado mononuclear nos tecidos hepáticos analisados, principalmente macrófagos.

Como já citado, estudos sobre a progressão da LV em ratos destacam que o baço e o fígado apresentam padrões distintos de resposta imune e de controle do parasita. A infecção no baço é mantida durante todo o curso da

doença. Já a infecção do fígado é resolvida por meio da formação de granulomas, que são caracterizados por células de Kupffer parasitadas, rodeadas por inúmeros linfócitos. É demonstrado que após 8 semanas de infecção, as formas amastigotas são mínimas em granulomas (LOEUILLET et al., 2016)

O desenvolvimento progressivo da fisiopatogenia esplênica está intimamente associado com altos níveis de TNF e IL-10. Um balanço imunológico determina as respostas que efetivamente promovem a depuração do parasita no fígado, ao passo que promove patologia no baço (STANLEY; ENGWERDA, 2007).

Uma hipótese para os resultados negativos nas amostras analisadas nesse exame, é que os *hamsters* utilizados no presente estudo foram assintomáticos, o que torna a perspectiva do diagnóstico histotológico menor, além da baixa probabilidade de encontrarmos formas amastigotas de *Leishmania infantum chagasi,* neste exame.

5.4 Diagnóstico sorológico

5.4.1 Teste de Aglutinação Direta

As amostras sorológicas encaminhadas para o teste de aglutinação direta não apresentaram titulação em nenhum dos *hamsters* dos 3 grupos, tanto aos 90 como 180 dias após a inoculação.

Apesar da RIFI ser um teste bastante utilizado e recomendado pelo Ministério da Saúde, neste estudo optou-se pelo uso do DAT. Uma das maiores vantagens que o teste apresenta é a não utilização de um conjugado de imunoglobulina espécie-específico, podendo ser útil em casos de infecções naturais e experimentais de mamíferos (GARCEZ et al., 1996).

Assis et al. (2015) demonstraram que DAT é um dos testes imunológicos que poderia substituir a RIFI, atualmente adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil, para o diagnóstico de LV. O teste foi validado no país e demonstrou alto desempenho, com sensibilidade e especificidade estimadas em 98%.

Outra vantagem do teste, é que o uso do antígeno liofilizado permite que seja armazenado à temperatura ambiente, o que faz com que se constitua numa valiosa ferramenta de diagnóstico para utilização a campo (MEREDITH et al.,1995).

Mesmo considerado sensível, o teste não demonstrou títulos de anticorpos em nenhum dos *hamsters* analisados neste estudo, nem mesmo no soro de animais inoculados com sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi*, tanto aos 90 dias como em 180 dias. O resultado sugere que o teste sorológico não é o mais indicado para o diagnóstico de leishmaniose visceral, sendo necessário outros mais específicos.

Laurenti (2009), cita que a soroconversão pode ocorrer três meses após infecção. Ferrer (1999) complementa que ao avaliar o resultado de um teste sorológico, deve ser considerado que este não tem 100% de sensibilidade, pois alguns cães, especialmente nas fases iniciais, são soronegativos.

O desempenho insatisfatório dos métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina tem sido destacado por Faria e Andrade (2012), pois subestimam o número de cães infectados, dificultando assim o controle da doença. Por essa razão, ao longo de muito tempo vem se estudando sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos.

Diante disso, SILVA et al. (2014) descrevem que somente um método diagnóstico não é suficiente para identificar todos os cães positivos com LVC, principalmente os assintomáticos. Por isso é necessária a associação de dois ou mais testes, sugerindo que o método imunocromatográfico rápido, associado ao ELISA ou RIFI para a investigação dessa enfermidade, são os mais indicados para uma maior sensibilidade no diagnóstico, principalmente dos cães sintomáticos.

Os *hamsters* em estudo não manifestaram sinais clínicos, o que possivelmente justifica o resultado do exame sorológico ser negativo para *Leishmania infantum chagasi,* mesmo no grupo doença, reforçando a necessidade de mais de um teste para o diagnóstico da leishmaniose.

Faria e Andrade (2012) discutem ainda as perspectivas com relação às novas tecnologias e antígenos para o diagnóstico da LVC, porém estes apresentam dificuldades na aplicação prática. Existem atualmente vários

métodos para o diagnóstico canino que empregam diversos antígenos, mas ainda não está disponível um antígeno altamente específico e que seja empregado com um método de fácil execução. Por essa razão o diagnóstico da LVC ainda é um desafio, apesar dos progressos observados no desenvolvimento de vários métodos diagnósticos.

5.5 Diagnóstico molecular

5.5.1 PCR convencional

Aos 90 dias de inoculação o resultado das análises pela PCR, das amostras de fígado, baço e medula óssea de um animal de cada grupo, foram negativas. Por outro lado, aos 180 dias, os resultados demonstraram que o parasita estava presente na maioria das amostras do grupo que recebeu sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* (Tabela 7) e também, do grupo que recebeu o sangue que passou por terapia com luz visível associada a AlClPc (Tabela 8):

Tabela 7- Resultados da PCR convencional, aos 180 dias, dos *hamsters* do grupo inoculado com sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi*, das amostras de baço, fígado e medula óssea.

Hamsters	**Baço**	**Fígado**	**Medula óssea**
1	Positivo	Negativo	Positivo
2	Positivo	Positivo	Positivo
3	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Positivo
5	Positivo	Positivo	Positivo

Tabela 8- Resultados da PCR convencional, aos 180 dias, dos *hamsters* do grupo inoculado com sangue tratado com luz visível associada à AlClPc, das amostras de baço, fígado e medula óssea.

Hamsters	**Baço**	**Fígado**	**Medula óssea**
1	Positivo	Positivo	Positivo
2	Positivo	Negativo	Positivo
3	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Positivo
5	Positivo	Positivo	Positivo

Ferrer (1999) cita que as técnicas moleculares como a PCR são muito úteis no diagnóstico de leishmaniose, no acompanhamento de pacientes durante e após o tratamento e na identificação da espécie de parasita. Neste caso não foi possível avaliar se a terapia com luz visível e AlClPc foi eficaz, necessitando de uma técnica quantitativa como a qPCR.

Apesar do fígado ser um dos órgãos hematopoiéticos, o que permite a realização da PCR no diagnóstico de leishmaniose, identificou-se neste estudo, duas amostras negativas, de um total de 10 analisadas.

Baneth e Aroch (2008) perceberam que a PCR realizada em diferentes tecidos de cães infectados mostraram resultados variáveis e divergentes. Isso poderá ser explicado em parte por uma distribuição heterogênea dos parasitas em cada tecido ou órgão parasitado, devido ao tropismo da cepa e a resposta imune local, o que pode justificar o resultado negativo de algumas amostras de fígado.

As análises realizadas pela PCR da medula óssea dos *hamsters*, foram positivas, tanto do grupo doença como o que recebeu sangue tratado, não sendo demonstrado se houve o efeito da luz visível associada à AlClPc neste órgão, reforçando a necessidade da realização da qPCR.

Maia et al. (2009) descrevem que a PCR para medula óssea tem sensibilidade de 89,7% e 100% de especificidade. Resultados semelhantes foram observados por Ferrer (1999), que comprovou que a técnica demonstra elevada sensibilidade e especificidade próximo de 100%, com aspirados de medula óssea.

Lachaud et al. (2002) reforçam que a sensibilidade do teste varia de acordo com a amostra, o que pôde ser evidenciado nos grupos desse trabalho, na medida em que, nas análises, o baço e a medula óssea apresentaram-se mais sensíveis do que o fígado.

Manna et al. (2004) afirmam que, em amostras de pele de cães aparentemente saudáveis, as análises da PCR foram positivas. Isso sugere que, independentemente da presença de lesões cutâneas, a PCR de biópsia de pele representa um bom substrato para o diagnóstico e acompanhamento da leishmaniose visceral canina.

Moreira et al. (2007) demonstraram que a PCR é 100% sensível em cães sintomáticos; 96 e 95,65% para grupos oligosintomático e assintomático

respectivamente, tendo 100% de especificidade. Nas amostras verificadas neste estudo, não foi encontrado 100% de positividade nos órgãos analisados, e uma provável justificativa estaria relacionada ao fato dos *hamsters* não serem sintomáticos.

Baneth e Aroch (2008) ressaltam que a eficácia da técnica da PCR ainda depende de diferentes fatores como *primers*, método de extração, material biológico e o protocolo. De um modo geral há uma grande variação na sensibilidade do método, particularmente no que se refere ao método de extração, das amostras utilizadas e do tempo de infecção (LACHAUD et al. 2002; IKONOMOPOLUS et al. 2003; MANNA et al. 2004).

Maia et al. (2007) sugerem que a PCR seja um exame complementar aos sorológicos, indicação corroborada por este estudo, que demonstrou que o exame imunológico utilizado, resultou em ausência de titulação, em todos os animais.

5.5.2 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Após 90 dias de inoculação, amostras de baço, fígado e medula óssea foram analisadas pela técnica da qPCR, de um *hamster* de cada grupo, e não foi detectado o DNA da *Leishmania infantum chagasi* no grupo controle saúde (G1) em nenhum dos órgãos, ao passo que no grupo que foi inoculado o sangue parasitado (G2) apenas no fígado não foi encontrado o parasita. Por outro lado, no G3, que recebeu o tratamento com luz visível e AlClPc, apenas o baço apresentou resultado negativo, porém o fígado teve a carga parasitária mais alta desse tempo de inoculação, comparando com os órgãos dos demais grupos nos diferentes tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9- Resultados da carga parasitária/mL, avaliados pela técnica da qPCR, no baço, fígado e medula óssea, de um *hamster* de cada grupo após 90 dias de inoculação.

Grupos	Baço	Fígado	Medula óssea
Saúde	Negativo	Negativo	Negativo
Controle	84,78/mL	Negativo	46,49/mL
Tratamento	Negativo	158,81/mL	65,64/mL

Após 180 dias de inoculação foram realizadas as análises do baço, fígado e medula óssea, pela qPCR. O resultado demonstrou a presença do parasita nos órgãos analisados de todos os *hamsters* do grupo inoculado com *Leishmania infantum chagasi* e do tratado com luz visível e AlClPc.

Neste tempo, a somatória da média da carga parasitária dos órgãos linfoides (baço, fígado e medula óssea) no grupo doença foi de 9,03 x 10^4(/mL), e no grupo que recebeu a terapia com luz visível associada à AlClPc resultou 5,75 x 10^4(/mL). Logo, foi demonstrado que houve redução de 36% do número de parasitas no grupo tratado. A análise da variância foi realizada para identificar diferença entre os grupos. Na ocorrência da significância da ANOVA ($P<0,01$) foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Hamsters que receberam sangue de cão positivo para *Leishmania infantum chagasi,* tratado com 191 µl de nanoemulsão AlClPc na concentração 45,84 µM, associada à exposição de luz visível no comprimento de onda de 630 nm, em uma potência de 136mW, na dose de 50J/cm^2 e com tempo de radiação de 11 minutos, apresentaram menor carga parasitária que os *hamsters* que receberam sangue de cão positivo para *Leishmania infantum chagasi* sem tratamento, nos órgãos analisados.

Foi verificado que, mesmo sendo significativa a redução da carga parasitária nos órgãos após a terapia com AlClPc e a incidência da luz visível, o baço foi o órgão que apresentou maior diferença entre os dois grupos. Contudo, foi encontrada a maior média de carga parasitária no grupo doença, aos 180 dias de inoculação (Tabela 10).

Tabela 10 – Resultados estatísticos da carga parasitária (/mL) obtida pela qPCR do baço, nos grupos doença (G2) e tratado com AlClPc (G3), irradiada com luz visível por 11 minutos, num comprimento de onda de 630 nm, após 180 dias de inoculação.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Saúde	0^c	0	0	0	0	0
Doença	$52404,6^a$	17054,7	51800	36083	78790	7627,1
Tratamento	$25660,4^b$	38706,6	11657	10	94335	17310,1

*Médias seguidas de letra diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Das amostras biológicas analisadas, o fígado foi a que apresentou a segunda maior carga parasitária, ocorrendo diferença significativa entre o grupo doença e o tratado. No entanto, foi o órgão que teve a maior média de carga parasitária, no grupo que recebeu o tratamento com luz visível associada à AlClPc (Tabela 11).

Tabela 11 – Resultados estatísticos da carga parasitária (/mL) obtida pela qPCR do fígado, nos grupos doença (G2) e tratado com AlClPc (G3), irradiada com luz visível por 11 minutos, num comprimento de onda de 630 nm, após 180 dias de inoculação.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Saúde	0^{c}	0	0	0	0	0
Doença	$32689,0^{a}$	9272,1	30333	22725	46787	4146,6
Tratamento	$28167,6^{b}$	4934,3	26116	23600	34500	2206,7

*Médias seguidas de letra diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A medula óssea, analisada pela quantificação de parasitas, apresentou a menor média de carga parasitária no grupo doença e tratado, comparada ao baço e fígado e a menor diferença entre os G2 e G3 (Tabela 12).

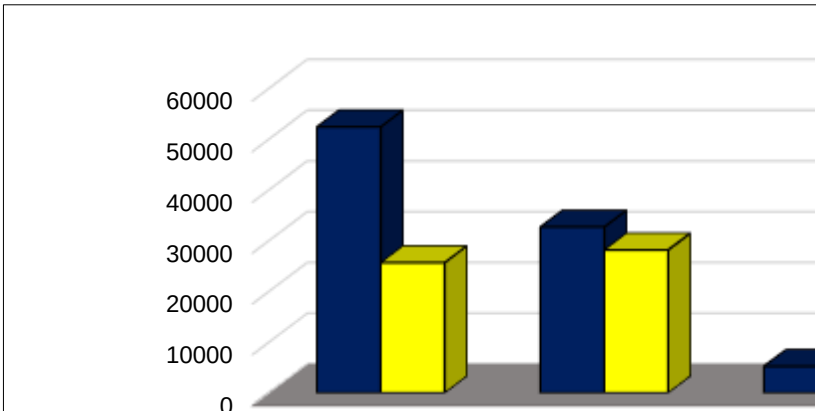
Tabela 12– Resultados estatísticos da carga parasitária (/mL) obtida pela qPCR da medula óssea, nos grupos doença (G2) e tratado com AlClPc (G3), irradiada com luz visível por 11 minutos, num comprimento de onda de 630 nm, após 180 dias de inoculação.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Erro padrão
Saúde	0^{c}	0	0	0	0	0
Doença	$5242,8^{a}$	2215,5	6040	1516	7118	990,8
Tratamento	$3656,8^{b}$	1530,6	3639	2075	5590	684,5

*Médias seguidas de letra diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados expressam que ocorreu diminuição significativa ($P<0,01$) da quantidade de parasitas no grupo tratado com luz visível associada a AlClPc, comparado ao grupo que recebeu o sangue parasitado (Figura 6) em todos os órgãos. Em um experimento com aves conduzido por Lopes (2015), fato semelhante foi observado com esse tratamento (luz visível associado a AlClPc), porém na inativação da bactéria *Borrelia arsenia*.

Figura 6- Médias da carga parasitária das amostras de órgãos analisadas, obtidas pela análise da qPCR, do grupo doença e tratado após 180 dias de inoculação.



Escobar et al. (2006) demonstraram que, utilizando terapia fotodinâmica com luz vermelha em um comprimento de onda de 670 nm, associada à fotossensibilizadores como a ftalocianina de alumínio e de zinco, ocorre a inibição, *in vitro*, de formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. panamensis.* No entanto, ressaltou que para confirmar a utilidade da terapia fotodinâmica na leishmaniose, é impreterível continuar os estudos testando a fotoatividade destes compostos em modelos animais.

Embora tenha sido utilizado um comprimento de onda menor que o estudado por Escobar et al. (2006), foi possível perceber que a luz visível associada à ALClPc diminuiu a concentração dos parasitas em um comprimento de onda vísível de 630-650 nm, em sangue inoculado no modelo experimental *Mesocricetus auratus*.

Poucos estudos têm sido feitos com o tratamento pela luz visível associada a AlClPc da *Leishmania infantum chagasi*, *in vivo*. Contudo, inúmeros trabalhos com essa terapia foram realizados na leishmaniose cutânea, com diferentes espécies do protozoário, demonstrando resultados favoráveis desse tratamento. Isso incentiva novos estudos, podendo constituir-se uma linha promissora de implementação para a inibição ou até mesmo eliminação do parasita no sangue.

Em trabalhos realizados por Peñaranda (2010) foi utilizada a terapia fotodinâmica associada à ftalocianina de cloro-alumínio em lesão cutânea em *hamsters*, provocada pela inoculação de *L. amazonenses*. Todos os animais

foram curados da lesão clínica após 12 semanas de terapia, porém não ocorreu a completa eliminação das formas amastigotas no sítio das lesões.

A redução significativa da carga parasitária do baço, fígado e medula óssea, demonstrada pela qPCR, provavelmente ocorreu por apoptose. Quintero (2010) demonstrou que na terapia fotodinâmica, associada à ftalocianina aplicada a formas amastigotas e promastigotas *(in vitro)* de *Leishmania panamensis*, ocorrem mudanças morfológicas, associadas a apoptose (diminuição do tamanho celular, perda do núcleo e citenoplasto) e fragmentação do DNA.

As mesmas alterações foram observadas por Valdivieso et al. (2008), porém nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis (in vitro)*, demonstrando que a terapia fotodinâmica é efetiva na eliminação de promastigotas deste parasita possivelmente por um mecanismo de apoptose.

Dutta et al. (2005), demonstraram que a *Leishmania amazonensis* fotossensibilizadas por ftalocianina são altamente suscetíveis a citólise, quando radiada por luz. Isto sugere que nessa terapia ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio, provavelmente devido à ineficácia dos mecanismos antioxidantes do parasita.

Pinto et al. (2011) também comprovaram alta taxa de morte celular (99%), *in vitro*, de *Leishmania braziliensis* e diminuição do crescimento do parasita em cultivo celular através da terapia fotodinâmica, porém num comprimento de onda de 659nm, na dose de energia de 10J/cm^2 associada a ftalocianina de silício.

Apesar de todos os órgãos dos animais dos grupos doença e tratado, serem positivos na qPCR, o fígado não apresentou amplificação da *Leishmania* na PCR convencional*,* em pelo menos um dos animais do grupo doença e um do grupo tratado. Isto demonstra que houve maior sensibilidade na qPCR, em relação ao PCR convencional, neste órgão.

Reis et al. (2013) compararam a sensibilidade da PCR e qPCR, em amostras de baço de 37 cães e os resultados foram de 81,1% e 100%, respectivamente. No presente estudo o baço e a medula óssea demonstraram carga parasitária tanto na PCR convencional como na qPCR, reforçando a alta sensibilidade do teste para estes órgãos.

O mesmo foi observado por Francino et al (2006), pois verificaram que enquanto a PCR convencional foi negativa para amostras que apresentaram menos que 30 parasitas/mL no sangue periférico ou medula óssea, a qPCR apresentou sensibilidade de 0,001 parasitas/mL. Sendo assim, RAMOS et al. (2012) descrevem a qPCR como melhor ferramenta de diagnóstico para detectar a infecção por *L. infantum chagasi*.

Cavalcanti (2008) comparou a PCR e qPCR nas amostras de sangue, e concluiu que a análise quantitativa tem uma sensibilidade de 100%, comparada com PCR que tem apenas 23,8%. Já a especificidade dos testes, demonstraram 83,3% e 100% para qPCR e PCR, respectivamente.

Os órgãos analisados neste estudo foram apropriados para o diagnóstico pela qPCR, pois todos apresentaram parasitas no grupo doença. Além disso, a técnica demonstrou ser satisfatória, já que foi possível avaliar os efeitos da luz visível associada à AlClPc no sangue de cão parasitado com *Leishmania infantum chagasi,* pois é um exame quantitativo, sendo essencial para o monitoramento dos tratamentos.

Dessa forma, pode-se confirmar que a qPCR foi o melhor método de diagnóstico para detectar a infecção por *L. infantum chagasi*. Francino et al. (2006) descrevem que a qPCR mostrou ser mais sensível que a técnica da PCR convencional no diagnóstico e monitoração da infecção canina, o que reforça esta afirmação.

Nascimento (2011) complementa que a qPCR pode ser utilizada em uma variedade de amostras biológicas para a quantificação da carga parasitária de cães naturalmente infectados por *Leishmania*. Em seu estudo demonstrou que o teste apresentou ter alta sensibilidade variando de 95 a 100% nas amostras de swab conjuntival, aspirados de linfonodo e de medula óssea.

Considerando vários fatores, Ramos et al. (2013) citam que não é possível eleger a amostra biológica mais apropriada para o diagnóstico, baseado apenas pela carga parasitária. Sendo assim, afirmam que devem ser analisadas outras características como a conveniência e a facilidade de obtenção da amostra para a realização do diagnóstico da *Leishmania*. Em sua pesquisa realizou a análise pela qPCR de medula óssea, linfonodo e baço, e a presença de *L. infantum* foi observada em 100% dos animais, em pelo menos uma das amostras biológicas analisadas.

Os resultados obtidos com a terapia fotodinâmica, utilizando luz visível associada à AlClPc, demonstraram que este tratamento do sangue positivo para *L. infantum chagasi* promove uma redução da carga parasitária, sendo importantes para dar continuidade à linha de pesquisa de inativação de patógenos no sangue. Cabe salientar que, como terapia alternativa da leishmaniose visceral canina, ainda faltam estudos mais específicos para a comprovação da sua eficácia e aplicabilidade.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com luz visível associada a AlClPc do sangue de cão positivo para *Leismania infantun chagasi* quando inoculado em *hamsters*, promove redução da carga parasitária.

Dos órgãos analisados, o baço foi órgão que apresentou a maior redução da carga parasitária após o tratamento com luz visível associada a AlClPc, seguido do fígado e medula óssea.

A análise parasitológica e o Teste de Aglutinação Direta não foram sensíveis para a identificação do parasita.

Os exames histológicos mostraram alterações compatíveis com reações inflamatórias, porém não se observaram formas amastigotas no baço, fígado e medula óssea.

A qPCR apresentou maior sensibilidade que a PCR no diagnóstico da leishmaniose em *hamsters* inoculados com sangue de cães parasitados com *Leishmania infantum chagasi*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*[14]

ALMEIDA, A.B.P.F. et al. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* v.42, n.2, p.156-159, 2009.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. v.20, n.1, p.259-265, 2004.

ARIAS, G.A.M. et al. Terapia fotodinâmica. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, v.35., n.6, p.255-268, 2007.

ASSIS, J. et al. Diagnóstico por RIFI e PCR de Leishmaniose visceral em cães sintomáticos e oligossintomáticos. *Veterinária e Zootecnia*, v.15, n.2, supl.1, p. 61, ago. 2008.

ASSIS, T.; SANTANA, M. Study of implementation and direct cost estimates for diagnostic tests for human visceral leishmaniasis in an urban area in Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.31, n.10, p. 2127-2136, 2015.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal Medical Research*, v.119, p.238-258, 2004.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Veterinary Journal*, v.175, p.14-15, 2008.

BASTOS, M.M. et al. O uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. *Revista Virtual de Química*, v.4, n.3, p.257-267, 2012.

BEZERRA, H.S.S. et al. Avaliação do Teste De Aglutinação Direta na Detecção da Infecção por *Leishmania (Vianna) Braziliensis e*m possíveis Reservatórios De Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* v.29, n.2, p.181 -184, 1996.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Disponível em: <https://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=09/10/2008>. Acesso em: 26 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília: Ministério da Saúde***,** 2006.120p.

[14] ABNT 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas***.** 1990 a 2011, Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília: Ministério da Saúde***,** 2014.120p.

BRITO, F.L.C., ALVES, L.C., LAUS, J.L. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina- revisão. *Revista Clínica Veterinária,* n.64, p. 68-78, 2006.

BROWN, S.B.; BROWN, E.A.; WALKER I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*, n.5, p.497-508, 2004.

CAVALCANTI, M.P. *Desenvolvimento e Avaliação de um Sistema Baseado em PCR em Tempo Real para o Diagnóstico da Infecção por Leishmania (Leishmania) Infantum em Cães,* 2008. 139f. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

ÇAMUR, M.; AHSEN, V.; DURMUS, M. The first comparison of photophysical and photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and indium (III) phthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 219 n. 2-3, p. 217-227, 2011.

CARDO, L.J. et al. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani infantum* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox Sanguinis,* v.90, p.85-91, 2006.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. *Veterinary Record*, v.141, p. 539-543, 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

CRUZ, C.D. Programa Genes: Biometria. Viçosa: UFV, 2006, 382p.

DUTTA, S. et al. Photodynamic Sensitization of *Leishmania amazonensis* in both Extracellular and Intracellular Stages with Aluminum Phthalocyanine Chloride for Photolysis in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 11, p. 4474–4484, 2005.

ESCOBAR, P. et al. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in Leishmania promastigotes. *Biomédica,* v.26, p.49-56, 2006.

EVANS, T.G. et al. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assesment of serodiagnosis methods. *American Journal os Tropical Medicine and Hygiene*, v.42, n. 2, p. 118-123, 1990.

FARIA NETO, H.C.C.; SANTOS, B.F. Fármacos usados em animais de laboratório- anestésicos e analgésicos. *Manual de Utilização de Animais-FIOCRUZ.* Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2008. cap.5, p. 20-27.

FARIA, A.R., ANDRADE, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde,* v.3, n.3, p.47-57, 2012.

FEITOSA, M.M. et al. Avaliação liquórica de cães, com e sem sintomatologia neurológica, naturalmente acometidos por Leishmaniose Visceral. *Veterinária Notícias*, v.11, n.2, p.61-69, 2005.

FERREIRA, E.C. et al. Comparação entre os testes de aglutinação direta (DAT), ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* v.36, supl.II, 2003. XIX Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses.

FERREIRA, E.C. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology,* v.146, p.235-241, 2007.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In:_____. Canine Leishmaniasis an update. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*. Barcelona: Spain, 1999. p.28-31.

FISA, R. et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripherical blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology,* v. 99. p. 105-111, 2001.

FORTES, E. *Parasitologia Veterinária.* 4.ed. São Paulo: Ícone, 2004. 607p.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v.137, p. 214–221, 2006.

FREITAS, E. et al. Transmisión of *Leishmania infantum* via blood transfusión in dogs: potencial for infection and importante of clinical factors, *Veterinary Parasitology,* v.137, p. 159–167, 2006.

GARCEZ, L.M. et al. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* v.29, n.2, p.165-180, 1996.

GIGER, U. et al. *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion*, v.42, p. 381-383, 2002.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, n.3, p.338-349, 2004.

GREENE, C.E. *Intections Disease of the dog and cat*. Philadelphia:Elsevier, 2006. Cap 73, p.685-698.

IKEDA, F.A. et al. Clinical and a parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to tratment with meglumine and allopurinol. *Brazilian Journal* of *Veterinary Research and Animal Science,* v.47, p.218 – 223. 2010.

IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples*. Veterinary Parasitology*, v.113, p.99-103, 2003.

ISSA, M. C. A.; AZULAY, M. M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. In: Anais Brasileiros de Dermatologia, v.85, n.4, p.501-511, 2010, Rio de Janeiro. *Anais eletrônicos*...Rio de Janeiro. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/abd/v85n4/v85n4a11.pdf. Acesso em: 23 out. 2015.

KRAUSPENHAR, C. et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural,* v.37, n.3, p.907-910, 2007.

LACHAUD, L. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v.6, n.67, p.13-23, 2009.

LEZNOFF, C.C., LEVER, A.B.P. *Phthalocyanines: Properties and Applications*. Vol. 2 e 3. New York. 1989.

LIMA, L.P.O. et al. Comparação entre o Teste de Aglutinação Direta e reação de Imunofluorescência Indireta no Diagnóstico de Leishmaniose Visceral em Pacientes Residentes em Pernambuco, Brasil. In: 62ª Reunião Anual da SBPC, 2010, Pernambuco. *Anais eletrônicos***....**Natal:UFRN, 2010. Disponível em: http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/5486.htm. Acesso em: 5 mar. 2016.

LOEUILLET, C.; BAÑULS, A.L.; HIDE, M. Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasites & Vectors*, v.9, n.144, p.1-12, 2016.

LOPES, L.G. *Estudos da luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio na inativação da Borrelia anserina*. 2015. 113f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MAIA, C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using diferente tissues. *The Veterinary Journal*, v.179, p. 142-144, 2009.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and imune response to infection. *Veterinary Parasitology*, v.158, p. 274-287, 2008.

MANNA, L. et al. Comparison of different tisuue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MARCONDES, M., ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,* v.50, n.5, p. 341-352, 2013.

MARTINS, N.S. et al. Alterações da Matriz Extracelular Esplênica em Cães Naturalmente Infectados com *Leishmania (Leishmania) Infantum Chagasi. Ciência Animal Brasileira*, v.16, n.1, p. 103-115, 2015.

MEREDITH, S.E.O. et al. *Leish*-KIT, a Stable Direct Agglutination Test Based on Freeze - Dried Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.7, p. 1742–1745, 1995.

MOREIRA, M. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methodos of leishmaniasis in dogs with diferente clinical signs. *Veterinary Parasitology*, v. 145, p. 245-252, 2007.

NAKASEKO, H. et al. Histological changes and involvement of apoptosis after photodynamic therapy for actinic keratoses*. British Journal of Dermatology*. v. 148, p. 122-127, 2003.

NASCIMENTO, C.S. *Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR real time) na avaliação da carga parasitária em cães naturalmente infectados por Leishmania sp.* 2011, 80f. Tese (Doutorado) - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador**.**

OLIVEIRA, G.G.S.; SANTORO, F.; SADIGUSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz,* n.88, p.243-248, 1993.

OLIVEIRA, K.T. et al. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. *Revista Virtual de Química,* v.7, n.1, p.310-335, 2015.

OWENS, S.D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal American Medical Association,* v.219, p.1076-1083, 2001.

PEDRAS, M.J.; RABELLO, A. Teste de aglutinação direta (DAT) e rk39-ELISA no diagnóstico da leishmaniose visceral humana**.** *Revista da Sociedade*

Brasileira de Medicina Tropical, v.36, supl.II, 2003. XIX Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses.

PEÑARANDA, I.P.H. *Actividad Fototoxica in vitro e in vivo de ftalocianina de Alumínio Clorada contra Leishmania amazonenses*. 2010. 110f. Dissertação (Mestrado) - Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colômbia.

PEREIRA, B.I., et al. Infecções parasitárias transmitidas por transfusão de sangue. *Acta Medica Portuguesa,* v. 24, p.897-906, 2011.

PINTO, J.G.; SOARES, C.P.; MITTMANN, J. Assessment of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* promastigote viability after photodynamic treatment with aluminum phthalocyanine tetrasulfonate ($AlPcS_4$). *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v.17, n.3, p. 300-307, 2011.

QUEIRÓZ, N.M.G.P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,* v. 19, n.1, p.32-38, 2010.

QUINTERO, W.V. *Marcadores de apoptosis em Leishmania panamensis inducidos por la terapia fotodinâmica utilizado ftalocianina de alumínio clorada como fotossensibilizador.* 2010, 110f. Dissertação (Mestrado) - Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colômbia.

RAMOS, R.A.N. et al. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum chagasi* in dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 3, p. 192-195, 2012.

RAMOS, R.A.N. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 3, p. 346-350, 2013.

RAMSEY, I.; MOORE, D.G., SHAW, S. Sistemas Hematopoiético e Linforreticular. In: RAMSEY, I.K.; TENNANT, B.J. *Manual de Doenças Infecciosas de Cães e Gatos*. São Paulo: Roca, 2010. Cap. 5, p.69-94.

REIS, L.E.S. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural ***Leishmania infantum*** infection. Veterinary Parasitology, v.197, n 3-4, p. 498-503, 2013.

RIÇA-CAPELA, M.J., et al. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitology Research*, v.89, n.3, p. 163-169, 2003.

ROJAS, E.; SCORZA, J.V. *Leishmania braziliensis:* aislamiento de lesiones por inoculación de hámsteres con o sin adición de lisado de glándulas salivares de *Lutzomyia youngi. Revista Saúde Pública,* v.29, n.1, p.1-5, 1995.

ROMÃO, R.P.R. *Análise histopatológica e ultra-estrutural de órgãos de hamster Golden (Mesocricetus auratus) infectados com isolados de Leishmania do complexo Braziliensis*. 2008. 86f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

ROSENTHAL I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochemestry and Photobiology,* v. 53, n.6; p.859-870, 1991.

ROSYPAL, A.C. *Characterization of Canine Leishmaniasis in the United States: Pathogenesis, Immunological Responses, and Transmission of an American Isolate of Leishmania Infantum.* 2005. 179f. Tese (Doutorado) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA.

SACCO, S.R. *Ação da luz ultravioleta e da riboflavina na inativação da Leishmania infantum chagasi em sangue canino conservado em bolsas para transfusão,* 2013*.* 124f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SAFI, S.H; EVANS, D.A. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* v. 83, n.3, p. 334-337, 1989.

SANTANA, C.C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. *Parasite Immunology*, v.30, p. 515-524, 2008.

SILVA, D.T. et al. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. *Brazilian Journal Veterinary Parasitolology*, v. 23, n. 2, p. 179-186, 2014.

SILVA, F.C.; BESSA, C. Eutanásia. *Manual de Utilização de Animais-FIOCRUZ.* Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2008. cap.8, p.37-45.

SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas,* v.1, n.1, p.20-31, 2007.

SILVA, O.V. *Avaliação do teste de aglutinação direta (TAD) no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA)*. 2003. 78f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

SOUZA, E.P. et al. Ocurrence of *Leishmania donovani* parasitemia in plasma infected hamsters. *Acta Tropica*, v.80, p. 69-75, 2001.

STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral Leishmaniasis*. Immunology and Cell Biology*, v.85, p. 138–147, 2007.

TABANEZ, P. Fisiopatologia da leishmaniose visceral canina. *VetScience,* n. 5, p.26-28, 2015.

TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.96, p. 203-212, 2001.

TASCA, K.I. et al. Exames parasitológicos, imunohistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. *Revista Brasileira de Parasitologia*, v.8, n.1, p.27-33, 2009.

TAYLOR, V.M.; CEDEÑO, D.L., ROBLEDO, S.M. Fototerapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutânea. *Infectología,* v.15, n.4, p. 277-288, 2011.

VALDIVIESO, W. et al. Efecto fototóxico de la terapia fotodinámica en promastigotes de Leishmania amazonenses. *Salud UIS*. p.1-19, 2008.

WIEDMANN, M.W; CACA, K. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology,* v. 5, p. 397-408, 2004.

WSPA- BRASIL. *Leishmaniose Visceral Canina. Um manual para o clinic veterinário. Sociedade Mundial de Proteção Animal*, 2011. Disponível em: < http://issuu.com/wspa_brasil/docs/manual-leishmaniose-wspa-brasil-011_issu> Acesso em: 02 nov.2015.

XAVIER, S.C. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research*, v.2, n.17, p.1-7, 2006.

ZHU, Y. et al. Novel silicon phthalocyanines axially modified by morpholine: Synthesis, complexation with serum protein and in vitro photodynamic activity. *Inorganic Chemistry Communications*, v.9, n.5, p.473-477, 2006.

8 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista Ciência Rural, seguindo as normas http://coral.ufsm.br/ccr/revista/normas.htm

Efeitos da luz visível associada à ftalocianina de cloro-alumínio na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue de cão, avaliados por métodos moleculares

Effects of visible light associated with chloro-aluminium phthalocyanine on the inactivation of Leishmania infantum chagasi in dog blood, as evaluated by molecular methods

Cristiane Beck [15]* *Raimundo Souza Lopes*[16] *Bruna Portolan Amaral*[17] *Luciana Mori Viero*[18] *Maria Andréia Inkelmann*[19] *Mateus Henrique Dambroz*[20] *Felipe Oliveski*[21] *Paulo Afonso Hubner Bonfada*[22]

RESUMO

A Leishmaniose Visceral é uma doença infecciosa, de caráter zoonótico, emergente e de notificação obrigatória. No Brasil tem como agente o protozoário *Leishmania infantum chagasi*, e o principal reservatório é o cão (*Canis familiaris*). A transfusão sanguínea é

[15] Departamento de Estudos Agrários, Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Rua do Comércio, n. 3000, Cep 98700-000, Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: cristianebeck11@gmail.com. *Autor para correspondência

[16] Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Prof. Doutor Walter Maurício Correa s/n, CP 560, Cep 18618-681, Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: souzalopes@fmvz.unesp.br

[17] Departamento de Medicina veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, **Prédio 63A**, Cep 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. brunaportolanamaral@gmail.com

[18] Departamento de Estudos Agrários, Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Rua do Comércio, n. 3000, Cep 98700-000, Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: luciana.viero@unijui.edu.br

[19] Departamento de Estudos Agrários, Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Rua do Comércio, n. 3000, Cep 98700-000, Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: maria.inkelmann@unijui.edu

[20] Departamento de Estudos Agrários, Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Rua do Comércio, n. 3000, Cep 98700-000, Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: mateusdambroz@gmail.com

[21] Departamento de Estudos Agrários, Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Rua do Comércio, n. 3000, Cep 98700-000, Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail:felipe.oliveski@gmail.com

[22] Departamento de Estudos Agrários, Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Rua do Comércio, n. 3000, Cep 98700-000, Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: paulo_bomber@yahoo.com.br

muito utilizada na rotina da clínica, entretanto está associada a transmissão de doenças infecciosas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com a luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino, quando inoculados em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Foram preparados 3 grupos experimentais compostos por 5 hamsters cada. O grupo controle recebeu sangue negativo para *Leishmania*, o grupo doença foi inoculado com sangue parasitado com *Leishmania infantum chagasi* e o grupo tratamento recebeu sangue parasitado tratado com luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio. Os animais foram monitorados por 180 dias e então submetidos a avaliação clínica. Em seguida os animais foram anestesiados para a coleta de sangue por meio de punção intracardíaca e procedendo-se assim a eutanásia. Após foi realizada a coleta do baço, fígado e medula óssea para serem acondicionados em tubos livres de DNAse e RNAse, congelados a -30ºC até a realização da PCR e qPCR. Na avaliação da PCR o baço e a medula óssea de todos os hamsters, dos grupos doença e tratado, apresentaram amplificação da *Leishmania infantum chagasi.* Na qPCR ocorreu uma significativa diminuição ($P<0,01$) na parasitemia quando comparado ao grupo tratado com a luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio, com o grupo que recebeu sangue parasitado sem tratamento. Com esses resultados é possível concluir que a luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio reduz a parasitemia da leishmaniose em sangue canino.

Palavras-chave: canino, leishmaniose visceral, luz visível, ftalocianina de cloro-alumínio, PCR, qPCR.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis is an emerging zoonotic infectious disease that requires mandatory reporting. In Brazil, it is caused by the protozoan *Leishmania infantum chagasi*, with dogs as main reservoir (*Canis familiaris*). Blood transfusion is frequently used in clinical routine, however it is associated with the transmission of infectious diseases. The aim of this study was to evaluate the effects of treatment with visible light associated with chloro-aluminium phthalocyanine on the inactivation of Leishmania infantum chagasi in canine blood, when inoculated in hamsters (*Mesocricetus auratus*). Three experimental groups consisted of six hamsters each. The control group received blood negative for *L. infantum chagasi*, the diseased group was inoculated with blood infected with *L. infantum chagasi*, and the treatment group received infected blood previously subjected to therapy with visible light associated with chloro-aluminium phthalocyanine. The animals were observed for 180 days and then subjected to clinical evaluation. Then the animals were anesthetized for blood collection through intracardiac puncture and were euthanized. Part of the liver, spleen and bone marrow were placed in tubes DNase and RNase free, and frozen at -30 ° C until the PCR and qPCR were performed. In the PCR evaluation of spleen and bone marrow, all hamsters from diseased and treated groups showed amplification of *Leishmania infantum chagasi.* Results from q-PCR revealed a significant decrease ($P < 0.01$) in the number of parasites in the group inoculated with blood subjected to chloro-aluminium photodynamic therapy, compared to the group inoculated with parasitized blood that had not been subjected to photodynamic therapy. With these results it is possible to conclude that visible light associated with chlorine-aluminum phthalocyanine reduces parasitaemia of Leishmania infantum chagasi in canine blood.

KEY WORDS: canine, visceral Leishmaniasis, visible light, chloro-aluminium phthalocyanine, PCR, qPCR.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, de caráter emergente, atualmente está distribuída em todo o território brasileiro (MARCONDES & ROSSI, 2013). O agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) no Brasil é a *Leishmania infantum chagasi.* Estes parasitas são transmitidos aos animais e ao homem pela picada de flebótomos do gênero *Lutzomyia longipalpis*, e os cães desempenham papel fundamental na sua epidemiologia (SILVA, 2007).

BRITO et al. (2006) descrevem que os sinais observados na leishmaniose canina são inespecíficos, como febre intermitente e duradoura, anemia, perda de peso progressiva e caquexia. RAMSEY et al. (2010) acrescentam linfadenopatia generalizada, dermatite esfoliativa, alopecia periocular, hiperceratose do coxim plantar, crescimento exagerado das unhas, dermatites ulcerativas nodulares e claudicação. OLIVEIRA et al. (1993), relatam que se faz necessário um período de 2 a 12 meses para que um cão infectado desenvolva sinais clínicos, e o período de incubação observado em condições experimentais pode alcançar 25 meses. SILVA (2007), afirma que em áreas endêmicas, os cães podem ser encontrados clinicamente assintomáticos ou sintomáticos.

Existem basicamente três categorias de provas utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose visceral: os métodos parasitológicos, os métodos sorológicos e os métodos moleculares (FERRER, 1999). A observação de formas amastigotas do parasita, de forma direta, poderá ser feita em esfregaços de aspirado de medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados com Giemsa, Leishman, Wrigth ou Panótico (BRASIL, 2006).

As técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde, para o inquérito canino, são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Teste Imunoenzimático (ELISA) (BRASIL, 2006). Como método molecular, a PCR tem sido muito útil no diagnóstico da LVC, em função da rapidez, sensibilidade e especificidade (IKONOMOPOULOS et al., 2003). Esse teste pode ser realizado em diferentes amostras, tais como aspirados de medula óssea, de linfonodos, sangue, urina e biópsias de pele.

Segundo ASSIS et al. (2008), a PCR pode ter eficácia no diagnóstico da leishmaniose, confirmando casos positivos e inconclusivos. Outro método utilizado para diagnóstico da leishmaniose, é a qPCR, que permite a quantificação dos parasitas, elucidando o *status* de cães positivos além de monitorar o número de parasitas durante e após o tratamento (FRANCINO et al. 2006).

Desde os anos 70, na China, foi utilizado para diagnóstico um método de isolamento de *Leishmania donovani*, por meio da inoculação de material suspeito em *hamsters* (*Mesocricetus auratus*). A partir desse momento, este se constituiu um modelo para o isolamento e conservação *in vivo* desses parasitas (ROJAS & SCORSA, 1995).

A transmissão de enfermidades infecciosas por meio da transfusão sanguínea é descrita por vários autores. A maior preocupação com os doadores caninos é a transmissão de protozoários, como babesiose e leishmaniose, devido ao longo período de incubação, persistência subclínica em animais infectados e a probabilidade de permanecerem viáveis na bolsa de sangue (FREITAS et al., 2006).

Atualmente, a terapia fotodinâmica é apresentada como uma alternativa para o tratamento da leishmaniose na forma cutânea (BASTOS, 2012) e sua ação já foi testada, *in vitro*, nas formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (ESCOBAR et al., 2006). A fototerapia é um procedimento no qual um agente fotossensibilizador, ao ser ativado por

luz, produz espécies reativas de oxigênio, que vão reagir com organelas, proteínas e DNA da célula, causando necrose das células que contém o agente fotossensibilizador (TAYLOR et al., 2011). As ftalocianinas são agentes fotossensibilizadores, eficientemente incorporados em células alvo, não são tóxicas para as células saudáveis e induzem uma ótima penetração de luz através do tecido, com alta absorção na faixa de espectro luminoso vermelho (670-780nm) (ÇAMUR et al., 2011). Na destruição das células alvo, mediada por espécies citotóxicas de oxigênio e de radicais livres, estão envolvidos mecanismos diretos tais como apoptose e necrose, e indiretos, entre eles, resposta imune e inflamatória (NAKASEKO et al., 2003).

ESCOBAR et al. (2006), afirma que formas promastigotas de *Leishmania chagasi* foram altamente suscetíveis à terapia fotodinâmica *in vitro* utilizando tratamento com ftalocianina de alumínio (AlPc) e iluminação de luz vermelha a 670 nm.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da terapia com luz visível associada à ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc) na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue de cão, quando inoculados em *hamsters* (*Mesocricetus auratus*), pelos métodos da PCR e qPCR, após 180 dias de inoculação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais utilizados para o referido estudo foram dois cães, um hígido e outro naturalmente infectado por *Leishmania Infantum chagasi*, e 15 *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) para a inoculação, sendo divididos em três grupos para o experimento. A leishmaniose do cão positivo foi confirmada por meio de o exame parasitológico, através da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de linfonodo pré-escapular. O sangue negativo foi confirmado por meio da qPCR.

O sangue positivo, colhido do cão por meio de punção da veia jugular, foi conservado em bolsa de sangue com conservante do tipo CPDA-1, mantida refrigerada

em uma temperatura em torno de 4 a 8ºC, até o momento do tratamento com luz visível associada a ALClPc. A terapia fotodinâmica foi realizada através da incidência da luz utilizando um dispositivo com o sistema BTH Quantum Tech. Este sistema de luz é contínuo (CW), com uma potência total na fibra óptica ao redor 0,3 W, em um comprimento de onda na faixa do visível (de 630 a 650 nm). Foi utilizado para o estudo na dose de 50 J/cm² e um tempo de radiação de 11 min. O fotossensibilizador utilizado foi AlClPc 45,89 μM. L^{-1}.

As amostras de sangue foram inoculadas, em 3 grupos, composto por 5 *hamsters* cada: grupo saúde (G1) que receberam 3,5 mL de sangue negativo para o parasita, via intraperitoneal; grupo doença (G2), receberam sangue positivo para *Leishmania infantum chagasi*; grupo tratamento (G3) que foram inoculados com sangue tratado pela luz visível associada a ALClPc, no mesmo volume dos grupos anteriores. Os animais foram observados por 180 dias e após foi realizada a eutanásia, para a coleta de material. Durante a necropsia foram coletadas porções do fígado, baço e medula óssea e congelados a -30°C, para o procedimento dos testes moleculares PCR e qPCR.

Para a realização da PCR convencional foram utilizados os *primers*: - 150: 5′ GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3′ e - 152: (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T) TTACACCAACCCC 3′. O perfil de ciclagem foi realizado primeiramente com a desnaturação inicial à temperatura de 95ºC por cinco minutos e após a execução de 29 ciclos, realizados a 95ºC por um minuto; 55ºC por 30 segundos e 72ºC por 10 segundos. A extensão final foi na temperatura de 72ºC por cinco minutos.

A qPCR foi executada com a extração de DNA com o Kit Illustra Tissue® & Cells Genomic Prep Mini Spin®[23], com algumas adaptações previamente padronizadas.

[23] GE HealthCare, EUA

As amostras submetidas a qPCR em tempo real, foram realizadas em duplicata, utilizando o sistema SYBR®Green, com o programa StepOneTM Plus Real Time PCR System equipment (Applied Biosystem®, Foster City, Califórnia, USA) e foram utilizados *primers*, que correspondem a 150: 5′ GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3′ e 152: 5′ (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T) TTACACCAACCCC 3′. A análise foi constituída pelas seguintes condições: 95ºC por 10 minutos, 40 ciclos de 95ºC por 15 segundos, 60ºC por um minuto e uma etapa para a curva de dissociação de 55 minutos (60ºC a 95ºC).

Os resultados foram submetidos a análise da estatística descritiva e da variância (ANOVA). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 tratamentos (grupo saúde, grupo doença e grupo tratado) com 5 repetições e teste de médias por Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para estas análises foi empregado o software GENES (CRUZ, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 180 dias de inoculação o resultado das análises pela PCR convencional, das amostras de fígado, baço e medula óssea demonstraram que o parasita estava presente na maioria das amostras, apenas duas amostras do fígado, uma do G2 e uma do G3, foram negativas. FERRER (1999) cita que as técnicas moleculares como a PCR são muito úteis no diagnóstico de leishmaniose, no acompanhamento de pacientes durante e após o tratamento e na identificação da espécie de parasita. Apesar do fígado ser um dos órgãos hematopoiéticos, o que permite ser realizada a PCR no diagnóstico de leishmaniose, identificou-se neste estudo duas amostras negativas, de um total de 10 analisadas. BANETH & AROCH (2008) perceberam que a PCR realizada em diferentes tecidos de cães infectados mostraram resultados variáveis e divergentes. Isso poderá ser

explicado, em parte, por uma distribuição heterogênea dos parasitas em cada tecido ou órgão parasitado, devido ao tropismo da cepa e a resposta imune local, o que pode justificar o resultado negativo de algumas amostras de fígado.

As análises realizadas pela PCR da medula óssea dos *hamsters*, foram positivas, tanto do grupo doença como o que recebeu sangue tratado, não sendo demonstrado se houve o efeito da luz visível associada a ALClPc neste órgão, reforçando a necessidade da realização da qPCR. MAIA et al. (2009) descreveram que a PCR para medula óssea tem sensibilidade de 89,7% e 100% de especificidade. LACHAUD et al. (2002) reforçam que a sensibilidade do teste varia de acordo com a amostra, o que pôde ser evidenciado nos grupos desse trabalho, na medida em que, nas análises, o baço e a medula óssea apresentaram-se mais sensíveis do que o fígado.

MOREIRA et al. (2007) demonstraram que a PCR é 100% sensível em cães sintomáticos; 96 e 95,65% para grupos oligosintomático e assintomático respectivamente, tendo 100% de especificidade. Nas amostras verificadas neste estudo, não foi encontrado 100% de positividade nos órgãos analisados, e uma justificativa estaria relacionada ao fato dos *hamster*s não serem sintomáticos.

O resultado da avaliação pela qPCR, em amostras do baço, fígado e descreve a carga parasitária/mL, de cada órgão de acordo com o grupo (Tabela 1). A análise da variância foi realizada para identificar diferença entre os grupos. Na ocorrência da significância da ANOVA ($P<0,01$) foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os resultados expressam que ocorreu uma diminuição significativa ($P<0,01$) da quantidade de parasitas no grupo tratado com luz visível associada a ALClPc, comparado ao grupo que recebeu o sangue parasitado. Em um experimento com aves

conduzido por LOPES (2015), fato semelhante foi observado com esse tratamento (luz visível associada à ALClPc), porém, na inativação da bactéria *Borrelia arsenia*.

Apesar de ser significativa a redução da carga parasitária após a terapia com luz visível associada a ALClPc, não ocorreu a eliminação do parasita, sendo o baço e a medula óssea os órgãos que tiveram maior diferença entre os dois grupos.

ESCOBAR et al. (2006) demonstrou que utilizando terapia fotodinâmica com luz vermelha em um comprimento de onda de 670 nm, associada a fotossensibilizadores como a ftalocianina de alumínio e de zinco, ocorre a inibição, *in vitro*, de formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. panamensis.*

Apesar de ter sido utilizado um comprimento de onda menor que estudado por ESCOBAR et al. (2006), foi possível perceber que a luz visível associada a ALClPc diminuiu a concentração dos parasitas em um comprimento de onda no visível de 630-650 nm, em sangue inoculado no modelo experimental *Mesocricetus auratus*.

A redução significativa da carga parasitária do baço, fígado e medula óssea, demonstrada pela qPCR, provavelmente ocorreu por apoptose. QUINTERO (2010) demonstrou que na terapia fotodinâmica, associada a ftalocianina aplicada às formas amastigotas e promastigotas *(in vitro)* de *Leishmania panamensis*, ocorrem mudanças morfológicas, associadas à apoptose (diminuição do tamanho celular, perda do núcleo e citenoplasto) e fragmentação do DNA.

Poucos estudos têm sido feitos com a terapia pela luz visível associada a ALClPc em *Leishmania infantum chagasi*, *in vivo*. Contudo, inúmeros trabalhos com essa terapia foram realizados na leishmaniose cutânea, com diferentes espécies do protozoário, demonstrando resultados favoráveis para esse tratamento.

Em trabalhos realizados por PEÑARANDA (2010) foi utilizada a terapia fotodinâmica associada à ftalocianina de cloro-alumínio em lesão cutânea em *hamsters*,

provocada pela inoculação de *L. amazonenses*. Todos os animais foram curados da lesão clínica após 12 semanas de terapia, porém não ocorreu a completa eliminação das formas amastigotas no sítio das lesões.

Fato semelhante foi comprovado por DUTTA et al. (2005), que demonstraram que a *Leishmania amazonensis* fotossensibilizada por ftalocianina são altamente suscetíveis a citólise, quando radiada por luz. Isto sugere que nessa terapia ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio, provavelmente devido a ineficácia dos mecanismos antioxidantes do parasita.

Os órgãos analisados neste estudo foram apropriados para o diagnóstico pela qPCR, pois todos apresentaram parasitas no grupo doença. Além disso, a técnica demonstrou ser satisfatória, já que foi possível avaliar os efeitos da luz visível associada à ALClPc no sangue de cão parasitado com *Leishmania infantum chagasi*, pois é um exame quantitativo, sendo essencial para o monitoramento dos tratamentos.

Os resultados obtidos com a terapia fotodinâmica, utilizando luz visível associada à ALClPc, demonstraram que este tratamento do sangue positivo para *L. infantum chagasi* promove uma redução da carga parasitária, sendo importantes para dar continuidade à linha de pesquisa de inativação de patógenos no sangue. Cabe salientar que, como terapia alternativa da leishmaniose visceral canina, ainda faltam estudos mais específicos para a comprovação da sua eficácia e aplicabilidade.

CONCLUSÃO

O tratamento da leishmaniose é ainda um grande desafio, pois existem muitos limites para a terapia convencional. A terapia fotodinâmica tem demonstrado eficácia na diminuição de várias espécies de *Leishmania*. Baseado nos resultados desse estudo, pode-se concluir que o tratamento do sangue de cães com luz visível associada a ALClPc, inoculado em *hamsters*, promoveu uma diminuição da carga parasitária no

baço, fígado e medula óssea, porém não acarretou na eliminação do parasita. A qPCR apresentou maior sensibilidade que a PCR no diagnóstico da leishmaniose em *hamsters*.

COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal da UNESP-Botucatu, seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de experimentação Animal (COBEA), sob o número do protocolo 40/2014 e 42/2014.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à FAPESP pelo apoio financeiro.

BIBLIOGRAFIA

ASSIS, J. et al. Diagnóstico por RIFI e PCR de Leishmaniose visceral em cães sintomáticos e oligossintomáticos. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.2, supl.1, p. 61, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpv/v19n1/a05v19n1>. Acesso em: 06 mar. 2014. doi:10.4322/rbpv.01901004.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Veterinary Journal*, v.175, p.14-15, 2008. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com.ez115.periodicos.capes.gov.br/S1090023306002553/1-s2.0-S1090023306002553-main.pdf?_tid=ff6828d8-1071-11e6-9d2d-00000aacb361&acdnat=1462199428_930aa8cd6c95c9a441e9993151b7c739>. Acesso em: 26 out. 2015. doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.011.

BASTOS, M.M. et al. O uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. **Revista Virtual de Química**, v.4, n.3, p.257-267, 2012. Disponível em:< http://rvq.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/237/226> Acesso em: 18 ago. 2013. doi**:** 10.5935/1984-6835.20120021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília: Ministério da Saúde**,** 2006.120p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf > Acesso em: 01 nov. 2015.

BRITO, F.L.C., ALVES, L.C., LAUS, J.L. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina- revisão. **Revista Clínica Veterinária.** n.64, p. 68-78, 2006.

ÇAMUR, M.; AHSEN, V.; DURMUS, M. The first comparison of photophysical and photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and indium (III) phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 219 n. 2-3, p. 217-227, 2011. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1010603011000761/1-s2.0-S1010603011000761-main.pdf?_tid=ee23cfce-1061-11e6-bcc8-00000aab0f26&acdnat=1462192527_50d66cbade88b976a3b693b00e64dfe6>Acesso em: 24 out. 2015. doi: doi:10.1016/j.jphotochem.2011.02.014

CRUZ, C.D. Programa Genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa, Minas Gerais. 382p. 2006.

DUTTA, S. et al. Photodynamic Sensitization of *Leishmania amazonensis* in both Extracellular and Intracellular Stages with Aluminum Phthalocyanine Chloride for Photolysis in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4474–4484, 2005. Disponível em: <http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC1280132&blobtype=pdf. > Acesso em: 17 abr. 2016. doi:10.1128/AAC.49.11.4474–4484.

ESCOBAR, P. et al. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in Leishmania promastigotes. **Biomédica**. v.26, p.49-56, 2006.

Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v26s1/v26s1a07.pdf >. Acesso em: 22 nov. 2015.

FERRER, L. M. Canine Leishmaniasis an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona: Spain, 28-31- 1999. Editor Killick-Kendrick. Disponível em: <http://www.studioveterinariosanrocco.it/Atti%201st%20Int%20CanL%20Forum%20Barcellona%201999.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2016.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.137, p. 214–221, 2006. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com.ez115.periodicos.capes.gov.br/S0304401706000288/1-s2.0-S0304401706000288-main.pdf?_tid=482cc0ac-0af4-11e6-a342-00000aab0f02&acdnat=1461595678_da925e3481caf030934c1d18cc40983c>. Acesso em: 25 out. 2015. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.011.

FREITAS, E. et al. Transmisión of *Leishmania infantum* via blood transfusión in dogs: potencial for infection and importante of clinical factors, **Veterinary Parasitology**. v.137, p. 159–167, 2006.<http://ac.els-cdn.com.ez115.periodicos.capes.gov.br/S0304401705006035/1-s2.0-S0304401705006035-main.pdf?_tid=daf0e846-0af4-11e6-9b2b-00000aacb35f&acdnat=1461595924_4bf16342f6bd6665b2578b212ca3caf2>. Acesso em: 22 nov. 2015 doi:10.1016/j.vetpar.2005.12.011.

IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology,** v.113, n.2, p.99-103, 2003. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com.ez115.periodicos.capes.gov.br/S030440170300061X/1-s2.0-S030440170300061X-main.pdf?_tid=44630c70-0af3-11e6-9f23-

00000aab0f6c&acdnat=1461595242_cebdab769261d75031d916a0633d3873>. Acesso em: 11 jul. 2015. doi:10.1016/S0304-4017(03)00061-X.

LACHAUD, L. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002. Disponível em: <http://jcm.asm.org.ez115.periodicos.capes.gov.br/content/40/1/210.full.pdf+html>. Acesso em: 27 mar. 2015. doi: 10.1128/JCM.40.1.210–215.2002.

LOPES, L. G. **Estudos da luz visível associada a ftalocianina de cloro-alumínio na inativação da *Borrelia anserina***. 2015. 113f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

MAIA, C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using diferente tissues. *The Veterinary Journal*, v.179, p. 142-144, 2009. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1090023307002948/1-s2.0-S1090023307002948-main.pdf?_tid=8d600eca-1203-11e6-9984-00000aab0f6c&acdnat=1462371894_2948ec024ddeacab198f419ba9133ad7>. Acesso em: 26 out.2015. doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.009.

MARCONDES, M.; ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.50, n.5, p. 341-352, 2013. Disponível em: http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/79913/83859 >. Acesso em: 01 nov. 2015. doi:org/10.11606/issn.2318-3659.v50i5p341-352 .

NAKASEKO, H. et al. Histological changes and involvement of apoptosis after photodynamic therapy for actinic keratoses. **British Journal of Dermatology**, v.148, n.1, p.122-127, 2003. Disponível em: <f <http://link.periodicos.capes.gov.br.ez115.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z3

9.88-2004&url_ctx_fmt=fi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rfr_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=954925386147&svc.fulltext=yes >. Acesso em: 27 mar. 2016.

MOREIRA, M. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methodos of leishmaniasis in dogs with diferente clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 245-252, 2007. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com.ez115.periodicos.capes.gov.br/S0304401706006996/1-s2.0-S0304401706006996-main.pdf?_tid=c8f91e72-0aec-11e6-9b6000000aab0f6b&acdnat=1461592458_fe7192b5c869a97cb9d749b05bdc9030>. Acesso em: 23 mar. 2016. doi:10.1016/j.vetpar.2006.12.012

OLIVEIRA, G.G.S. et al. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, n.88, 243-248, 1993. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v88n2/vol88(f2)_067-072.pdf> Acesso em: 24 out. 2015.

PEÑARANDA, I. **Actividad Fototoxica in vitro e in vivo de ftalocianina de Alumínio Clorada contra Leishmania amazonenses**. 2010. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Básicas Biomédicas)-Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colômbia.

QUINTERO, W. V. Marcadores de apoptosis em Leishmania panamensis inducidos por la terapia fotodinâmica utilizado ftalocianina de alumínio clorada como fotossensibilizador. 2010, 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Básicas Biomédicas)-Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colômbia.

RAMSEY, I. et al. Sistemas Hematopoiético e Linforreticular. In: RAMSEY, I.K.; TENNANT, B.J. **Manual de Doenças Infecciosas de Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2010. Cap. 5, p.69-94.

ROJAS, E.; SCORZA, J.V. *Leishmania braziliensis:* aislamiento de lesiones por inoculación de hámsteres con o sin adición de lisado de glándulas salivares de *Lutzomyia youngi.* **Revista Saúde Pública,** v.29, n.1, p.1-5, 1995. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/rsp/v29n1/02.pdf >. Acesso em: 31 out. 2015.

SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. Revista Tropica, v.1, n.1, p. 20-31, 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/220000420_Patologia_e_patogenese_da_leishmaniose_visceral_canina>. Acesso em: 24 out. 2015.

TAYLOR, V.M.; CEDEÑO, D.L., ROBLEDO, S.M. Fototerapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutânea. **Infectología**. v.15, n.4, p. 277-288, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v15n4/v15n4a10.pdf >. Acesso em: 26 out. 2015.

TABELA

Tabela 1- Médias dos resultados da carga parasitária/mL, nos diferentes órgãos dos grupos avaliados.

Grupo/variável	Baço	Fígado	Medula óssea
1	0^{c}	0^{b}	0^{c}
2	$46404,6^{a}$	$32689,0^{a}$	$6042,8^{a}$
3	$10558,6^{b}$	$28167,6^{a}$	$3256,8^{b}$

***Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.**

ANEXO A

unesp

fmvz - unesp

ATESTADO

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Estudo dos efeitos da luz visível associada à ftalocianina na inativação da *Leishmania infantum chagasi* no sangue de cães",** Protocolo nº 40/2014-CEUA, do Professor Raimundo Souza Lopes, desta Faculdade, a ser conduzido por **Cristiane Beck** foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 11 de abril de 2014.

Profª.Ass.Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO B

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO

fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Efeitos da luz visível associada à ftalocianina no sangue de cães parasitados com *Leishmania infantum chagasi*"**, Protocolo nº 42/2014-CEUA, do Professor Raimundo Souza Lopes, desta Faculdade, a ser conduzido por **Cristiane Beck** foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 11 de abril de 2014.

Profª.Ass.Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO C

Paciente: [redacted] Golden Retriever, Fêmea, 2 Anos.

Proprietária: [redacted]

EXAME CITOPATOLÓGICO

Tipo de Amostra: PAAF de Linfonodo pré-escapular

Tipo de Exame: Pesquisa de Hematozoário

RESULTADO

- Foram observadas formas amastigotas típicas de *Leishmania* sp. na presente amostra.

Araçatuba, 09 de Setembro de 2014.

Acácio Duarte Pacheco
Médico Veterinário
CRMV/SP 25063